

„Einfluss von Bortezomib in Xerogel-Biomaterialien auf die Knochenbildung und Knochenresorption im Tiermodell“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nora Kröhle
aus Kirchheimbolanden

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Gutachter: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. Christian Melzer

Tag der Disputation: 03.12.2018

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	LITERATURÜBERBLICK	4
2.1	Knochen als dynamisches Gewebe	4
2.2	Multiples Myelom	15
2.3	Bortezomib	22
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Prüfsubstanz: Mit Bortezomib funktionalisiertes Silikat/Kollagen-Xerogel	28
3.2	Versuchstiere und Zeitplan des Tierversuchs	31
3.3	Operation, Nachbehandlung und Euthanasie	33
3.4	Herstellung der Technovit 9100 Schnitte	37
3.5	Standardfärbungen	40
3.6	Enzymhistochemische Untersuchungen	42
3.7	Immunhistochemie	44
3.8	Histomorphometrie	52
3.9	Statistik	53
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Makroskopische Befunde	55
4.2	Histologische Befunde	55
4.3	Enzymhistochemische Ergebnisse	61
4.4	Immunhistochemische Ergebnisse	67

4.5	Histomorphometrie	75
5	DISKUSSION	83
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	SUMMARY	99
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
10	TABELLENVERZEICHNIS	110
11	LITERATURVERZEICHNIS	111
12	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	124
13	DANKSAGUNG	125
14	TABELLARISCHER LEBENSLAUF	126
14	ANHANG	127

1 Einleitung und Fragestellung

“*Gesund alt werden*” ist ein häufig verwendeter Slogan, der zwar ein wenig abgenutzt wirkt, jedoch insbesondere aus medizinischer Sicht nach wie vor aktuell ist und die medizinische Forschung in vielen Bereichen prägt. In einer alternden Gesellschaft steigt das Risiko für Erkrankungen des menschlichen Skeletts, die in Folge einer eingeschränkten Mobilität die Lebensqualität erheblich reduzieren und somit gerade in der Unfallchirurgie und Orthopädie eine wichtige Rolle spielen. Osteoporose aber auch weniger populäre Erkrankungen wie das Multiple Myelom haben eine große Relevanz im klinischen Alltag. Das Multiple Myelom ist eine maligne Neoplasie des Knochenmarks und geht durch eine Zersetzung der spongiösen Knochenstruktur gehäuft mit Osteolysen einher.

Aus einem pathologischen Knochenmetabolismus, wie er bei diesen Krankheiten vorherrscht, resultieren Knochenschwund und komplexe Knochenbrüche. Diese werden konservativ oder chirurgisch versorgt. Instabile Knochenfrakturen benötigen eine Fixierung mithilfe von Osteosynthesematerialien um eine adäquate Frakturheilung zu gewährleisten. Herkömmliche Osteosyntheseverfahren wie Platten- und Schraubenosteosynthesen, Verriegelungsnagel und Fixateur externe erzielen jedoch gerade bei Trümmerfrakturen, kleinen Frakturen oder schlechter Knochenvascularisierung oft nur unzureichende Ergebnisse (Heiss and Schnettler, 2005).

In vielen Fällen kommt es bei pathologischen Frakturen, beispielsweise auf Grund eines Multiplen Myeloms, zu Knochensubstanzdefekten, die eine Auffüllung des knöchernen Defekts erforderlich machen. Hierfür stehen neben autogener (körpereigener) und allogener (körperfremde) Spongiosa auch Knochenersatzmaterialien zur Verfügung. Trotz hoher klinischer Relevanz ist die Forschungslage über neue Knochenersatzmaterialien unzureichend. Bei Verbundosteosynthesen weisen gängige Biomaterialien wie beispielsweise Polymethylmetacrylat (PMMA) Materialmängel wie das Auftreten von Polymerisationshitze und toxischen Reaktionen auf das Monomer und Polymer auf (Webb and Spencer, 2007). Aus diesem Grund ist es unter anderem anzustreben neue Erkenntnisse über innovative Biomaterialien zu erlangen.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde ein sogenannter Verbundwerkstoff aus Kollagen und Silikat, den unserer Kooperationspartner der Universität Dresden neu entwickelten, verwendet. Das Biomaterial wurde für die hier vorgestellte tierexperimentelle Untersuchung ausgewählt, da das Silikat/Kollagen Material integrations stimulierende Effekte in die Extrazellulärmatrix aufweist und es sich zudem aufgrund seiner mesoporösen Struktur als Drug-Delivery-System eignet (Heinemann et al., 2007a; Heinemann et al., 2007b).

Neben der Biokompatibilität des innovativen Biomaterials wurde erstmals der Effekt von lokal appliziertem Bortezomib auf spongiösen Knochen untersucht. Hierfür wurde in Wasser gelöstes Bortezomib in definierten Konzentrationen in das Silikat/Kollagen-Xerogel eingebettet. Anschließend wurde es im Rahmen der tierexperimentellen Untersuchungen zur Defektauffüllung bei Ratten benutzt.

Bortezomib wurde dem Biomaterial hinzugefügt, da es als Proteasomeninhibitor erfolgreich zur Therapie des Multiplen Myelom eingesetzt wird. Aktuelle Publikationen belegen, dass die systemische Therapie mit Bortezomib zu einer Erhöhung des Knochenvolumens führt und so die Anzahl der Osteolysen verringert (Deleu et al., 2009). Bisher existieren jedoch weder Forschungsergebnisse über die *in vivo* Verträglichkeit des Biomaterials noch über die lokale Applikation von Bortezomib auf spongiösen Knochen.

Für die Untersuchungen wurde ein Tiermodell ausgewählt, um die Wirkungsweise der verwendeten Materialien und die Wechselwirkung mit dem lokalen Knochengewebe aufzuzeigen. Dies ist nötig um die Untersuchungsergebnisse bezüglich der Biokompatibilität sowie des Effekts auf den Knochenstoffwechsel adäquat beurteilen zu können.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Einwachsverhalten des innovativen Verbundwerkstoffs erstmalig *in vivo* zu untersuchen und zudem den Effekt des lokal applizierten Bortezomibs auf das Knochengewebe darzustellen.

Zusammenfassend sollen im Zuge der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

- Wirkt das Biomaterial aus neuem Silikat/Kollagen Verbundwerkstoff biokompatibel auf den Knochen und das umliegende Gewebe?

- Hat das lokal applizierte Bortezomib einen Effekt auf den Knochenstoffwechsel, insbesondere auf die Knochenbildung und die Knochenresorption?
- Treten unerwartete Reaktionen im Bereich des Implantats mit dem umliegenden Gewebe auf?
- Ist der Effekt auf den Knochenstoffwechsel von der Dosis des lokal applizierten Bortezomibs abhängig?

2 Literaturüberblick

2.1 *Knochen als dynamisches Gewebe*

Das menschliche Skelett besteht aus 220 einzelnen Knochen, die bei einem adulten normgewichtigen Mann ca. 10 kg wiegen und 15 % des Körpergewichts ausmachen (Bartl, 2010). Die verschiedenen Knochen unterliegen einem ständigen strukturellen Wandel aufgrund von regenerativen Prozessen wie Knochenaufbau und Knochenumbau. Diesen komplexen Mechanismen liegt eine Kaskade zellulärer Abläufe zugrunde. Die beteiligten Zellsysteme kooperieren miteinander und sind voneinander abhängig.

Im Zuge dieses Kapitels wird zunächst einleitend der Knochenaufbau grob skizziert, dem folgt eine Erläuterung der daran beteiligten Zellsysteme (Osteoklasten, Osteoblasten etc.), da dies zum Verständnis von Knochenerkrankungen wie dem Multiplen Myelom, aber auch von Forschungsansätzen über Knochenersatzmaterialien essentiell ist. Im Anschluss werden die verschiedenen Phasen des Knochenumbaus dargestellt, da eine Störung in einem dieser Abläufe komplexe Pathologien und eben jene für diese Studie relevante Knochenerkrankungen hervorrufen. Der Knochenumbau wird von komplexen Hormon- und Zellsystemen reguliert deren Ausführung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, weshalb exemplarisch lediglich das RANK-RANKL-OPG-System detailliert vorgestellt wird, da der Nachweis eben jener Zytokine auch bei den hier vorgestellten Untersuchungen zur Messung der Knochenaktivität verwendet wurde.

Knochenaufbau

Röhrenknochen sind von einer äußeren dicken Kortikalis begrenzt, die von einem faserreichen, periostalen Bindegewebe überzogen wird. Die Kortikalis, auch Kompakta genannt, ist sehr dicht, da sie bis zu 90 % kalzifiziert ist und macht den größten Teil des Knochengewichts aus. Der Markraum wird von der filigranen Spongiosastruktur eingenommen. In den Spongiosazwischenräumen und in der Markhöhle befindet sich

das Knochenmark, der Ort hämatopoetischer und mesenchymaler Stammzellbildung. Während die langen Röhrenknochen zu einem Hauptanteil aus Kompakta bestehen, findet sich im axialen Skelett (z.B. Wirbelkörper) dagegen vor allem spongiöser Knochen (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). Die Spongiosa ist aus Knochenbälkchen aufgebaut, die im Vergleich zur Kompakta in einer viel geringeren Dichte angeordnet sind, dafür aber eine 10-fach größere Oberfläche haben. Das *bone remodelling* findet hauptsächlich im spongiösen Knochen statt, hier werden jährlich ca. 25 % umgebaut, während im kortikalen Knochen jährlich nur 2,5 % erneuert werden. Pathologien des Knochenumbaus wie bei Osteoporose oder Knochenschwund manifestieren sich dementsprechend zuerst und zum größten Teil im spongiösen Knochen (Bartl and Bartl, 2013).

Der mikroskopische Aufbau des Knochens wird anhand des Aufbauprinzips eines Osteons deutlich. Osteone gelten als funktionelle Grundbausteine des Knochens. Sie bestehen aus konzentrisch um einen zentralen Gefäßkanal, den sogenannten HAVERSschen Kanal, angeordneten baumrindenartigen Lamellenschichten. In Bindegewebe eingebettet verlaufen im Osteon Kapillaren, Nerven- und Lymphbahnen. Diese sind mit gefäßführenden, quer durch den Knochen verlaufenden VOLKMANNschen Kanälen verbunden (Heinemann, 2010).

Durch den Abbau alter Osteone und gleichzeitiger Osteonneubildung entsteht ein Mosaikmuster aus unterschiedlich alten Osteonen und dazwischenliegenden Resten der periostalen Ringlamellensysteme (sogenannten Schaltlamellen). Diese Umbauprozesse werden von knocheneigenen Zellsystemen bestimmt, wie beispielsweise den Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Sie reglementieren das Knochenwachstum und in späteren Lebensabschnitten das *bone remodelling*. Weiterhin spielt das *microenvironment*, das von Zellen wie Adipozyten, Fibroblasten, Adventitiazellen und Endothelzellen gebildet wird, eine wichtige Rolle bei der Bildung und Steuerung der funktionellen Einheit aus Knochen und Knochenmark (Moschetta et al., 2016; Bartl and Bartl, 2013).

Osteoklasten

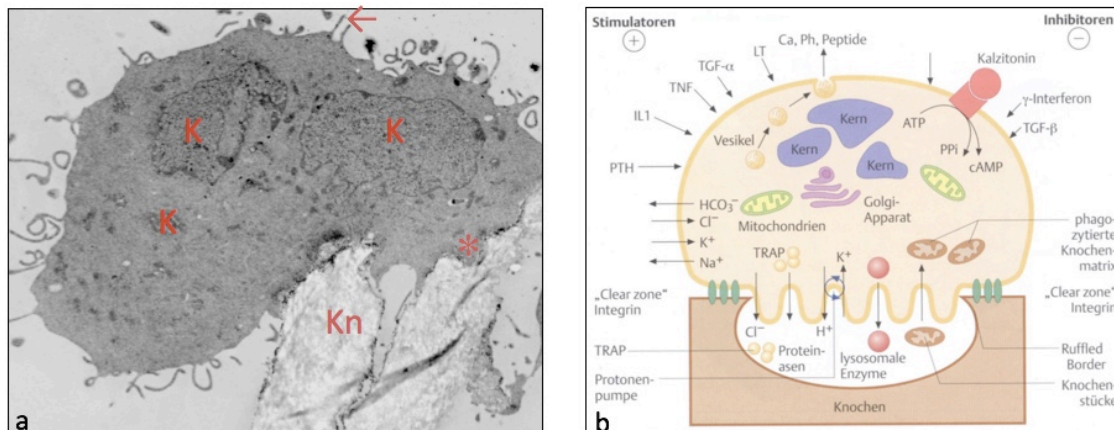


Abbildung 1a:

In Epon eingebettete TEM-Aufnahme zeigt einen in der Zellkultur angezüchteten Osteoklasten auf Knochenfragment.

K = Zellkerne, Kn = Knochenfragment, ← = Mikrovilli, * = Zellorganellfreie Zone (typisch im Bereich des Aktinringes)

Abbildung 2b:

Darstellung eines Osteoklasten und seiner charakteristischen Eigenschaften

[aus Bartl, 2010]

Der Name der knochenresorbierenden Osteoklasten leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „Knochenbrecher“. Die mehrkernigen Riesenzellen mit einem Durchmesser von bis zu 100 µm haben eine vergleichsweise kurze Lebensdauer von durchschnittliche knapp 2 Wochen (Bartl, 2010).

Osteoklasten sind im Gegensatz zu Osteoblasten und Osteozyten Abkömmlinge der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (*progenitor cell*) und leiten sich vom Granulozyten- Makrophagen-System ab. Aus der Progenitorzelle differenziert sich die Osteoklastenvorläuferzelle (*precursor cell*). Durch Fusion dieser postmitotischen Vorläuferzellen, die mononukleären Phagozyten entsprechen, entstehen schließlich Osteoklasten (Lambrecht, 1991).

Bei vermehrtem Osteoklastenbedarf müssen zuerst pluripotente hämatopoetische Stammzellen über Blutgefäße zur knochenresorptionsaktiven Region transportiert werden.

Erst danach kommt es zur Osteoklastenproliferation. Hierin unterscheiden sich die Osteoklasten erheblich von den restlichen Zellen des Knochengewebes. Die

mesenchymalen Stammzellen der Osteoblasten können beispielsweise auf einen Reiz lokal am Ort der Knochenformation proliferieren.

Osteoklasten (Abb. 1a, b) ähneln den Makrophagen in vielen strukturellen und enzymatischen Eigenschaften. So verfügen beide Zelltypen über Zellorganellen wie beispielsweise Lysosomen und Golgi Apparat, die sie zur Phagozytose befähigen. Osteoklasten besitzen einen Bürstensaum „ruffled border“, eine dem Knochen zugewandte stark gefaltete Plasmamembran, mit der sie in der Lage sind große Mengen proteolytischer Enzyme (saure Phosphatasen) zu sezernieren. Mithilfe saurer Phosphatasen wie beispielsweise TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), Cathepsin k und Matrixmetalloproteinasen können sie mineralisiertes Gewebe auflösen. Im Anschluss phagozytieren Osteoklasten das Gewebe und bauen es schließlich mithilfe primärer und sekundärer Lysosomen im Zytoplasma lysosomal ab. Hierfür verfügen Osteoklasten über zahlreiche energieerzeugende Mitochondrien und H⁺-ATPasen (Dominguez et al., 2011).

Der Bürstensaum wird von einer *sealing zone* umgeben, die reich an Aktinfilamenten und Integrinen ist und für den sicheren Knochenkontakt und die Begrenzung der Resorptionszone sorgt (Rau, 2009).

Die Differenzierung der Osteoklasten wird durch verschiedene Regelkreise mithilfe von Hormonen und Zytokinen gesteuert, die es ermöglichen, dass die Anzahl und Aktivität der Osteoklasten schnell an ossäre und extraossäre Situationen angepasst werden kann. Osteoklasten können in einer Zeiteinheit bis zu 3mal mehr Knochen abbauen, als die langsamer arbeitenden Osteoblasten ihn aufbauen. Im Vordergrund der Regulation reifer Osteoklasten stehen zwei Faktoren. Zum einen RANKL (ligand of receptor activator of nuclear Kappa-B), das an späterer Stelle näher beschrieben wird, und zum anderen das von Osteoblasten produzierte Zytokin M-CSF (makrophagen-colony stimulating factor). Es konnte gezeigt werden, dass M-CSF essentiell an der Proliferation und Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen beteiligt ist (Kitaura et al., 2014).

Der Knochenumbau und somit die Funktion der verschiedenen Knochenzellen unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen. Vitamin D (Synonym: Calcitriol) und verschiedene körpereigene Hormone wie Parathormon, Östrogen, Kalzitinin,

Kortikosteroide, Schilddrüsenhormone, ACTH, Androgene und STH beeinflussen den Knochenstoffwechsel und sind so unter anderem für die Konstanthaltung des Serumkalziumspiegels verantwortlich.

Weiteren Einfluss auf den Knochenabbau haben verschiedene Botenstoffe über die Steuerung der Osteoklastenaktivität. OAF, TNF, Prostaglandin E₂, IL-1 und Lipoproteine führen zu einer gesteigerten Aktivität. Diphosphonate, Mithramycin, Glucocorticoide und Colchicin inhibieren die Aktivität.

Osteoblasten, Osteozyten und Endostzellen

Osteoblasten sind einkernige, kuboide, etwa 20 bis 30 µm große Zellen, deren primäre Aufgabe die Knochenbildung ist. Sie stammen von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) ab. MSCs sind multipotente Zellen, die sich in Osteoprogenitorzellen, Chondrozyten, Adipozyten, Endothelzellen und Fibroblasten differenzieren können. Sie kommen im Knochenmark vor und gelangen über gerichtete Migration mittels Wachstumsfaktoren wie BMP-2, BMP-4 und PDGF-BB in peripheres Gewebe (Mukherjee et al., 2008).

Auf gezielte Reize differenzieren sich MSCs zu Osteoprogenitorzellen, die sich mitotisch teilen können und zu Osteoblasten heranreifen. Die Differenzierung der Osteoblasten wird von Wachstumsfaktoren wie TGF, BMP, IGF, Hormonen, Zytokinen, Vitaminen und Spurenelementen wie Strontium und Calcium über verschiedene Signalwege reguliert (Patil and Paul, 2014).

Exemplarisch wird an dieser Stelle der Einfluss des Wnt/ β -Catenin Signalweges erläutert, der die Osteoblastogenese stimuliert. Wnts sind Wachstumsfaktoren, die über eine Bindung an verschiedene Rezeptoren (wie beispielsweise low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) und Frizzled (FZD) Rezeptoren) zahlreiche Signalkaskaden auslösen. Unter anderem führt eine Wnt Rezeptor Bindung zu einer Aktivierung von β -Catenin. Daraufhin kommt es zu einer Translokation von β -Catenin in den Nukleus und dort zu einer Aktivierung von T-Zell spezifischen Wachstumsfaktoren (TCF). Über diesen Signalweg wird die Differenzierung von MSCs zu Osteoblastenvorläuferzellen gefördert (Bodine and Komm, 2006).

Die Hauptfunktion der Osteoblasten besteht in der Synthese von Knochenmatrix mithilfe der alkalischen Phosphatase (AP). Sie erzeugen hohe Phosphatkonzentrationen, die durch Überschreiten der Löslichkeit zu einem Niederschlag von Calciumphosphat führen. In diese organische Grundsubstanz lagern Osteoblasten Kollagen-Typ-1 ein, welches zu Kollagenfibrillen aggregiert. Das entstandene Osteoid wird anschließend mineralisiert, indem Mineralsalze abgegeben und in Form von Apatit eingelagert werden. Für die Osteoidsynthese verfügen Osteoblasten über Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat. Osteoblasten produzieren zudem Calcium-bindende Proteine (wie Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin) und BMPs (Murshed et al., 2005).

Osteoblasten sind über Zytoplasma Fortsätze netzwerkartig miteinander verbunden, wodurch eine genaue Regulation der Osteoblastenfunktion und des Knochenaufbaus möglich ist. Wachstumshormone wie IGF (IGF-I, IGF-II), TGF-Beta, FGF und PDGF werden von Osteoklasten und der Knochenmatrix sezerniert und steuern die Osteoblastenaktivität. Transkriptionsfaktoren wie Runx2 und Wachstumsfaktoren wie BMPs, TGFs, FGFs beeinflussen die Osteoklastendifferenzierung. Fluoride, Statine, Strontium und PTH aktivieren Osteoblasten, Leptin hingegen hemmt sie (Dominguez et al., 2011).

Ungefähr jeder 10. Osteoblast wird zum Osteozyten, indem er seine Synthesefunktion einstellt, um knapp 30% seines Volumens schrumpft und sich in die kalzifizierende Matrix einbauen lässt (Rau, 2009; Bartl and Bartl, 2013). Osteozyten kommunizieren untereinander über weit verzweigte Zellausläufer, sogenannte Canaliculi, und transportieren über diese Ionen im Knocheninneren. Die Canaliculi sind mit Knochenflüssigkeit gefüllt und durch Gefäßkanäle (Haverssche und Volkmannsche Kanäle) miteinander verbunden. Auf diese Weise entsteht ein kommunizierendes Netzwerk zwischen intrakortikalen Gefäßen, Osteoblasten und Osteozyten. Hierüber beeinflussen Osteozyten und Endostzellen den Knochenumbau.

Endostale Belegzellen („lining cells“) entstehen aus inaktiven Osteoblasten. Erhalten Osteoblasten keine Stimuli zur Knochensubstanzbildung, stellen sie ihre Syntheseaktivität ein und flachen zu Endostzellen ab. Diese bedecken epithelartig die

gesamte extrazelluläre Knochenoberfläche und machen zusammen mit den Osteozyten 95% der Knochenzellen aus.

Endostzellen beeinflussen darüber hinaus die Osteoklastenaktivierung durch Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, die die Knochenresorption sowohl fördern als auch hemmen. Identifiziert wurden diesbezüglich bereits ODF, OPGL, TRANCE und RANKL. Die OPG (Osteoprotegrin) Synthese wird wiederum von PTH, PGE2, IL-1 und 1,25- Vitamin-D gehemmt und bewirkt so eine gesteigerte Knochenresorption.

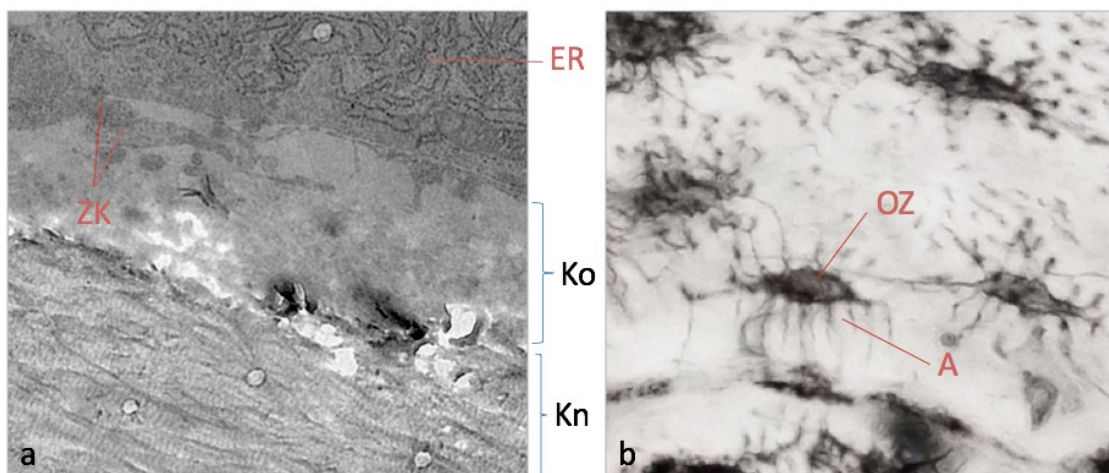


Abbildung 2a:

In Epon eingebettete TEM-Aufnahme zeigt einen Osteoblasten auf neu gebildetem Kollagen. ER = Endoplasmatisches Retikulum im Osteoblast, ZK = Zellkontakte, Ko = frisches Kollagen, Kn = mineralisierter Knochen

Abbildung 2b:

Uneingebettete Aufnahme eines trockenen Knochens in TEM stellt die zentral in der Knochenmasse eingebetteten Osteozyten (OZ) mit Zytoplasmaausläufern (A) in Canaliculi ossei dar.

bone remodelling

Der Knochen als dynamisches Organ ist metabolisch hochaktiv und unterliegt einem ständigen *remodelling* (Umbau), das nicht mit dem Wachstumsabschluss beendet ist, sondern auch im Erwachsenenalter kontinuierlich stattfindet. Bartl [2010] beschreibt den Knochen deshalb als „eine ständige Baustelle“. Dieser Ausdruck soll verdeutlichen, dass der Knochen keineswegs ein unveränderliches und starres Konstrukt ist, sondern vielmehr ein dynamisches Gewebe, das einem hohen strukturellen Wandel unterliegt, sodass es anpassungsfähig und belastbar bleibt (Rau, 2009). Der Knochenumbau, der sich als komplex darstellt und insgesamt einen jährlichen Umsatz

von 2 % aufweist, hat verschiedene Funktionen: Die Mobilisation des Kalziums, die Adaption des Knochens an veränderte Belastungen und Stresssituationen und schließlich die Reparaturfunktion. Unter Letzterem wird nicht nur die Frakturheilung verstanden, sondern auch die Heilung zahlreicher Mikrofrakturen, die physiologisch ständig im Knochen auftreten und deren Anzahl einen wichtigen Parameter für das Frakturrisiko darstellt.

Der komplexe Prozess des Knochenumbaus wird in verschiedene Formen unterteilt (Adler, 2004; Dominguez et al. 2011). Die periostale Knochenbildung ist für das Längen- und Dickenwachstum in der Skelettentwicklung sowie der Wachstumsphase verantwortlich. Die hier relevante endostale Knochenbildung, auch als *bone remodelling* bezeichnet, charakterisiert dagegen einen lebenslang ablaufenden Knochenumbau in sogenannten *Basic Multicellular Unit*, BMUs. Zwischen 2-5 Mio. BMU- Einheiten stehen dem Knochengewebe zur Verfügung. Der Umbau dauert ungefähr 120 Tage und wird in verschiedene Phasen unterteilt, die im Folgenden näher erläutert werden (Abb. 3).

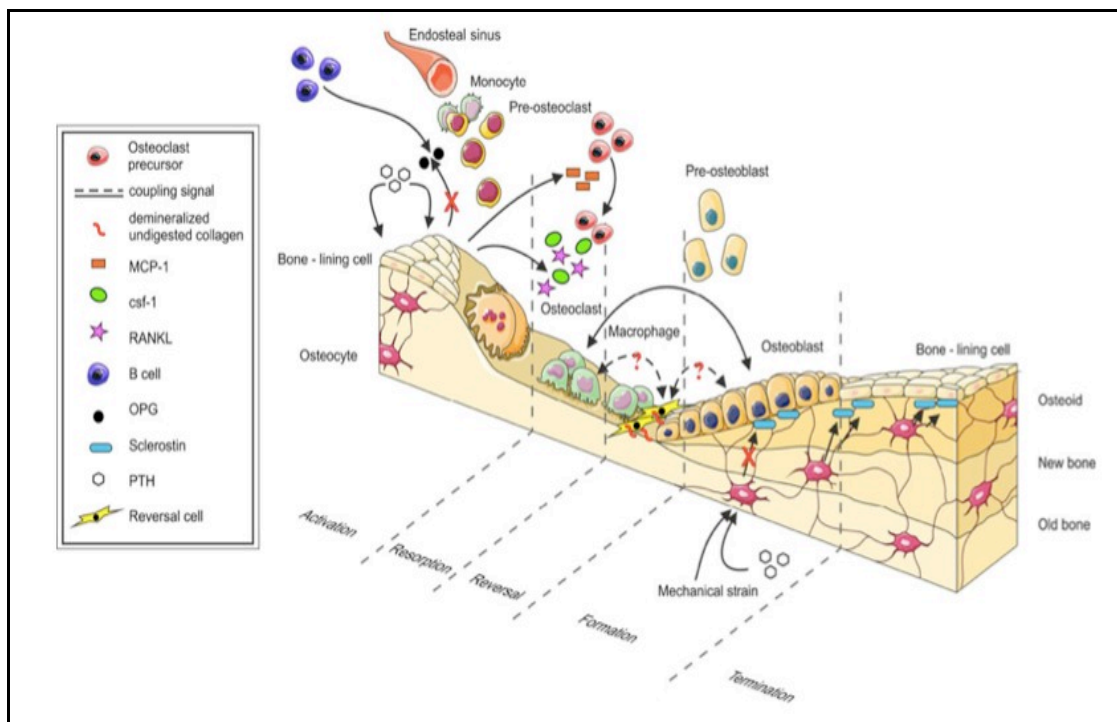


Abbildung 3:

Überblick über die verschiedenen Phasen des Knochenumbaus und die daran beteiligten Zellsysteme und Botenstoffe.

[aus Dominguez et al., 2011]

Erhält der Knochen keinen spezifischen Reiz zum Umbau verhartet er in einer *Ruhephase*. Hier ruhen die inaktiven Osteoblasten als Endostzellen schützend auf der Knochenoberfläche. Durch verschiedene Stimuli wie Hormone (z.B. PTH), Zytokine, mechanische Reize etc. kann das Knochengewebe jederzeit in die *Aktivierungsphase* übergehen. Diese ist durch die Retraktion der Endostzellen, die Resorption einer dünnen, die Knochenoberfläche abgrenzende Kollagenmembran, durch Matrix-Metallproteinasen sowie die Migration von Osteoklastenvorstufen charakterisiert. Die Differenzierung hämatopoetischer Precursorzellen in Osteoklasten wird maßgeblich von RANKL und OPG reguliert (Bartl, 2010) und im nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

In der *Resorptionsphase* kommt es zur vermehrten Osteoklastenaktivierung. Hierbei sind neben RANKL und OPG noch zwei weitere Regulatoren zu erwähnen. Das Chemokin MCP-1 induziert durch Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren die Chemotaxis. Es bestimmt entscheidend die Migration von Monozyten und ferner die Osteoklastenbildung (Deshmane et al., 2009). Csf-1 (colony stimulating factor-1 auch als M-CSF bekannt) ist ein Zytokin, das von Osteoblasten freigesetzt wird und ebenfalls die Osteoklastendifferenzierung stimuliert.

Die eingewanderten Osteoklasten bauen Knochengewebe ab und bilden so eine Resorptionslakune. Diese wird in der darauffolgenden *Umschaltphase* (Abb. 3: „Reversal“) geglättet und Osteoblasten differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen. Die Osteoblasten synthetisieren in der *Mineralisationsphase*, wie bereits erläutert, zuerst nicht verkalktes Osteoid, welches dann in einem zweiten Schritt mineralisiert wird. Erst nach dieser Phase ist der Umbau abgeschlossen und das Knochengewebe erlangt wieder seine vollständige Belastbarkeit und Funktionalität. Osteozyten exprimieren verschiedene Stoffe wie Sklerostin und MEPE/ OF45, die die Knochenmineralisation inhibieren und so eine überschießende Osteoblastenaktivität verhindern. Andererseits exprimieren Osteozyten auch Promotoren der Mineralisation wie die Knochenproteine Dmp1 und Phex und spielen so eine zentrale Rolle in der Regulation des Gleichgewichts zwischen Demineralisation und Mineralisation (Bonewald, 2007).

Die Osteoblasten wandeln sich nach dieser Phase in Endostzellen um, damit ist die *Ruhephase* wieder erreicht und eine von etwa 35 Mio. „strukturellen Knocheneinheiten“ ist entstanden. Zu betonen ist an dieser Stelle die unterschiedliche Zeitdauer der einzelnen Phasen. Die Resorptionsphase ist nach nur knapp 2 Wochen abgeschlossen, während die Mineralisationsphase mehrere Monate dauern kann (Dominguez et al., 2011).

RANK-RANKL-OPG-System

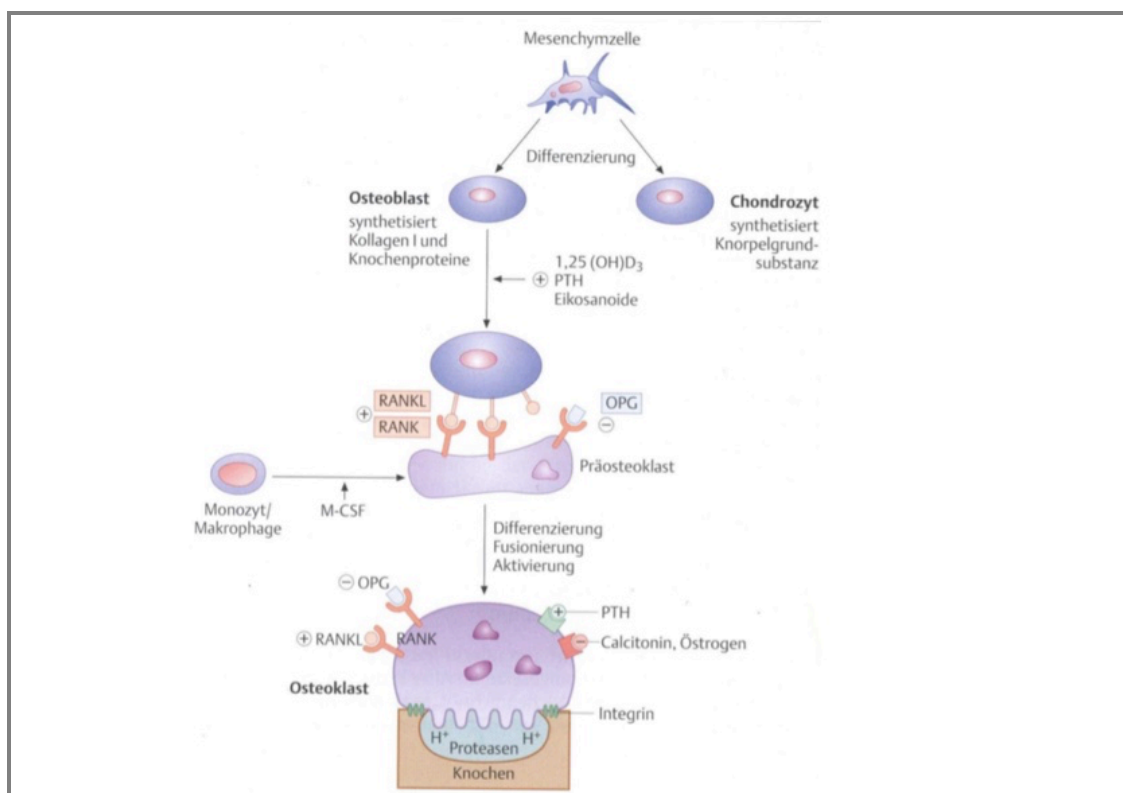


Abbildung 4:

Das RANK- RANKL-OPG System und seine Wirkung auf die Osteoklastogenese
[aus Bartl, 2010]

Der Knochenumbau und die ihn regulierenden lokalen zellulären Interaktionen werden von unterschiedlichsten Agenzien wie systemischen Hormonen, Vitaminen, lokal produzierten Zytokinen und elektromagnetischen Potentialen beeinflusst. Es wird an dieser Stelle darauf verzichtet all diese Systeme näher zu erläutern. Exemplarisch wird lediglich das RANK-RANKL-OPG-System detaillierter beschrieben, da es an der

Steuerung der Knochenumbauvorgänge maßgeblich beteiligt ist und für das Verständnis der Osteoklastengenese essentiell ist.

Das RANKL-OPG-Zytokinsystem (Abb. 4) beeinflusst die Differenzierung von Osteoklasten und somit das *bone remodelling*. RANKL, ein Mitglied der TNF- Familie, wird hauptsächlich von Zellen der Osteoblastenlinie synthetisiert und exprimiert. Ferner produzieren auch aktivierte T- Lymphozyten RANKL und aktivieren so unter anderem dendritische Zellen (Udagawa, 2003).

Das Knochengewebe interagiert zudem mit Zellen der hämatopoetischen Stammreihe. Dies wird zum Beispiel daran ersichtlich, dass RANKL Blutmonozyten aus der Peripherie anlockt, die sich anschließend in Osteoklasten differenzieren. Makrophagen, Monozyten und Osteoblastenvorstufen produzieren wiederum M-CSF, welches die Differenzierung von Präosteoklasten zu Osteoklasten stimuliert (Boyce and Xing, 2008).

Wird RANKL von Osteoblasten exprimiert, aktiviert es seinen spezifischen zellulären Rezeptor RANK. Die Aktivierung von RANK wird als ein Schlüsselstimulator der Osteoklastenreifung angesehen.

Inhibiert wird dieses System von einem weiteren Mitglied der TNF-Familie, dem OPG (Osteoprotegerin). OPG wird ebenfalls von Osteoblasten und Stromazellen synthetisiert und hemmt als endogener Rezeptorantagonist RANKL und somit die Osteoklastendifferenzierung (Lacey et al., 1998).

Kommt es zu einer vermehrten RANKL Expression unter anderem durch PTH, Vit D und Eikosanoide, führt dies zu einer vermehrten RANK-RANKL Bindung. Der Rezeptor RANK befindet sich auf Präosteoklasten. Seine Aktivierung führt zur Differenzierung, Fusionierung und Aktivierung der Osteoklasten. Weiterhin sind RANK Rezeptoren auf der Oberfläche reifer Osteoklasten zu finden und regulieren dort das Überleben der Osteoklasten. Diese Rezeptoren werden gleichermaßen von RANKL stimuliert wie von OPG inhibiert. Auf diese Weise wird eine direkte Beeinflussung der Osteoklasten, beispielsweise durch Regulation ihrer Lebensdauer, möglich (Bartl, 2010).

Zahlreiche Hormone, Zytokine und Medikamente beeinflussen den Knochenumbau über das RANKL-OPG-Zytokinsystem. $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$ und Östrogen erhöhen die OPG Expression und hemmen so die Knochenresorption. PTH und Glucocorticoide haben

sowohl Einfluss auf OPG als auch auf RANKL. Sie erhöhen die RANKL-Bildung und hemmen die OPG-Bildung, was beides einen stimulierenden Effekt auf den Knochenabbau hat. Prostaglandin E2 vermindert die OPG Expression, wohingegen BMP-2, Vit K, Leptin, Raloxifen, Statine, Bisphosphonate und mechanische Kräfte die OPG-Produktion stimulieren (Bartl, 2010)

2.2 Multiples Myelom

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Multiplen Myelom, da es eine maligne Neoplasie ist, die gehäuft mit pathologischen Knochenveränderungen und daraus resultierenden komplexen Knochenfrakturen einhergehen kann. Die adäquate Versorgung dieser Defektfrakturen erfordert nicht selten den Einsatz von Knochenersatzmaterialien. Diese Biomaterialien zusätzlich mit einem Proteasomeninhibitor zu verbinden, um so die lokale Therapie bei Knochensubstanzdefekten von mit Multiplem Myelom erkrankten Patienten zu ermöglichen, war eine Grundidee dieser Arbeit.

Im folgenden Kapitel wird zunächst die Erkrankung in Grundzügen beschrieben und zudem der Einfluss des Multiplen Myeloms auf den Knochenstoffwechsel genauer dargestellt.

Das Multiple Myelom ist ein malignes B-Zell-Non-Hodking-Lymphom, das durch die Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark und die daraus resultierende vermehrte Produktion monoklonaler Immunglobuline charakterisiert ist.

Die Bedeutsamkeit des Multiplen Myeloms und seiner Therapiemöglichkeiten wird bei der Betrachtung der Epidemiologie offensichtlich. 10% der hämatologischen Krebserkrankungen und 1% der gesamten Krebserkrankungen sind Multiple Myelome (Harousseau and Moreau, 2009). Die Inzidenz liegt bei 6-7 Fällen / 100.000 pro Jahr. Es ist eine Krankheit des höheren Lebensalters. Die Patienten sind bei Erstdiagnose im Durchschnitt zwischen 60 und 70 Jahre alt (Kehrer et al, 2017).

Beim Multiplen Myelom kommt es zur Infiltration des Knochenmarks, verursacht durch in peripheren lymphatischen Organen entartete Plasmazellen und somit zur

Verdrängung der normalen Hämatopoese. Die malignen Plasmazellen setzen Zytokine frei, die eine vermehrte Osteoklastenaktivierung und dadurch einen erhöhten Knochenabbau bewirken. Daraus resultiert eine Zersetzung der spongiösen Knochenstruktur, die zu Knochenschmerzen, Osteolysen und pathologischen Frakturen führen kann (Singhal and Mehta, 2006).

Krankheitsverlauf und Symptomatik

Die Ausprägung der Erkrankung ist sehr variabel. Sie reicht von asymptomatischen Verläufen, bei denen die Erkrankung nur durch routinemäßige Kontrollen des Blutbildes detektiert wird, bis hin zu schwersten Krankheitsmanifestationen mit zum Teil kompletter Immobilität durch große Wirbelkörperdestruktionen und damit einhergehenden spinalen Kompressionen (Goldschmidt, 2002).

Genetische und klinische Daten belegen, dass die Erkrankung in fast allen Fällen mit einer klonalen Vermehrung der Plasmazellen beginnt. Die das Knochenmark infiltrierenden Zellen proliferieren und führen so zu einem asymptomatischen prämaligen Vorstadium des Multiplen Myeloms. Dieses Vorstadium wird als *monoclonal gammopathy of unknown significance* (MGUS) bezeichnet. Es ist einerseits durch einen M- Protein-Nachweis von < 3 mg/dl im Serum und $< 10\%$ intramedullärer klonaler Plasmazellen und andererseits durch das Fehlen jeglicher Knochenläsionen und myelombedingter Symptome wie Anämie, Verschlechterung der Nierenfunktion oder Hyperkalzämie definiert. MGUS ist eine relativ häufig vorkommende Erkrankung, zwischen 3-5% aller Menschen > 50 Jahre sind betroffen. Eine MGUS geht regelhaft einem Multiplen Myelom voraus. Bei knapp 1 % der MGUS Patienten kommt es pro Jahr zu einer malignen Transformation, aus der eine maligne Plasmazellerkrankung wie beispielhaft das Multiple Myelom resultiert (Kehrer et al., 2017).

Die darauffolgende Krankheitsphase wird als *smouldering myeloma* oder *indolent myeloma* bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine zytostatische Therapie erforderlich, in der Regel ist der Verlauf weiterhin asymptomatisch. Es können jedoch beginnende Knochenveränderungen ohne Hyperkalzämie und eine Knochenmarksinfiltration von 10 - 30 % nachgewiesen werden (Goldschmidt, 2002).

In vielen Fällen entwickelt sich aus einem nicht behandlungsbedürftigen *smouldering myeloma* ein symptomatisches und behandlungspflichtiges intramedulläres Myelom, was schließlich in ein extramedulläres Myelom und eine Plasmazellleukämie übergeht (Harousseau and Moreau, 2009).

Das Multiple Myelom wird durch klonale Plasmazellen $> 10\%$ im Beckenkamm, eine monoklonale Gammopathie im Serum oder Urin und durch myelomassozierte Organsystem- oder Gewebeschädigungen nach CRAB-Kriterien definiert. Die CRAB-Kriterien stehen hierbei für eine *hypercalcemia*, *renal insufficiency*, *anemia* sowie *bone lesions* (Kehrer et al., 2017).

In den symptomatischen Phasen des Multiplen Myeloms kommt es aufgrund des infiltrierten Knochenmarks und der vermehrten Osteoklastenaktivität zu dem Bild einer Osteoporose mit vermehrtem Abbau der Knochensubstanz, vorwiegend der spongiösen Trabekel. Hieraus resultieren bei 70% der Patienten Knochenschmerzen und pathologische Frakturen. Am häufigsten sind Wirbelkörper und Schädelkalotte betroffen, gefolgt von Becken, Femur und Rippen (Goldschmidt, 2002; Adler, 2004). Durch die Knochendestruktionen kommt es ab einer mittleren Tumorzellmasse ($0,6-1,2 \times 10^{12}$ Zellen/m² KOF) zu einer Hyperkalzämie ($>2,6$ mmol/l). Weitere Leitsymptome sind eine Anämie und eine Infektanfälligkeit. Die Anämie, an der 50% der Patienten leiden, ist bedingt durch die Infiltration des Knochenmarks und der daraus resultierenden Verdrängung der Hämatopoese. Die Infektanfälligkeit entsteht durch einen sekundären Mangel an polyklonalen Immunglobulinen. Durch die exorbitante monoklonale Immunglobulinproduktion, die aus der Plasmazellproliferation resultiert, kommt es zu einer Plasmazytose, die wiederum zu einer Nierenschädigung führt. Insbesondere die Leichtketten der Immunglobuline lagern sich in den Nierentubuli ab und verlegen diese (Kehrer et al., 2017).

Interaktionen zwischen Myelomzellen und der Mikroumgebung des Knochenmarks

Die Entstehung des Multiplen Myeloms ist durch komplexe Veränderungen in den malignen Zellen und in den zentral beteiligten Stromazellen des Knochenmarks, sowie durch spezifische Veränderungen der umgebenden Mikroumgebung („microenvironment“) des Knochengewebes charakterisiert.

Aus der Interaktion zwischen entarteten Plasmazellen (Myelomzellen) und der Mikroumgebung des Knochenmarks resultieren weitreichende Auswirkungen auf das Knochengewebe (Abb. 5). Zu Beginn der Pathogenese erfolgt die folgenschwere Adhäsion der Myelomzelle an Stromazellen des Knochenmarks. Die Adhäsion ermöglicht die Interaktion zwischen den beiden Zellen und in Folge dessen die Beeinflussung des Knochengewebes. Der direkte Kontakt wird von Myelomzellen über Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 und VLA-4 aufrechterhalten. Als Folge der Interaktion wird die Stromazelle zur Produktion von Zytokinen wie Interleukin-6, VEGF, IGF, SDF-1alpha, BAFF, APRIL, HGF und TNF-alpha angeregt. Die produzierten Zytokine und Interleukine stimulieren wiederum die Myelomzelle zur vermehrten Aktivität und zur Aufrechterhaltung der Adhäsion (Hideshima et al., 2004).

Zudem beeinflussen Myelomzellen die Knochenzellen (Abb. 5). Über Interleukin-3 hemmt die Myelomzelle die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen. Daraus resultiert eine geringere Anzahl von Osteoblasten und somit ein gehemmter Knochenaufbau. Zwei weitere Zytokine (hepatocyte growth factor (HGF) und Dickkopf-related protein 1 (DKK-1)) inhibieren ebenfalls die Osteoblastendifferenzierung und Osteoblastenaktivität: HGF wird durch die Stimulierung der Myelomzellen vermehrt von Stromazellen produziert; DKK-1 wird dagegen durch die Interaktion von Myelomzellen und Stromazellen gehäuft von Myelomzellen sezerniert. Zusammenfassend kann an dieser Stelle betont werden, dass die Myelomzelle eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen der Stromazelle bewirkt und darüber eine verminderte Osteoblastenaktivität induziert (Hideshima et al., 2007).

An dem hier beschriebenen Pathomechanismus spielt das Zytokin Interleukin-6 mit seinen zahlreichen Effekten eine zentrale Rolle. Die Myelomzellen synthetisieren TGF-Beta, das eine vermehrte Ausschüttung von Interleukin-6 durch die Stromazelle induziert. Osteoklasten und Endothelzellen sezernieren ebenfalls Interleukin-6 und tragen so zur Stimulation der Myelomzellen bei (Abb. 5). Interleukin-6 bewirkt bei der Myelomzelle verstärktes Zellwachstum, eine erhöhte Proliferation und Migration. Ferner regt es die B-Zell-Differenzierung zu Plasmazellen an und vermittelt so eine Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika (Hideshima et al., 2014).

Von besonderem Interesse ist zudem die Rolle der Osteoklasten. Diese werden sowohl von MIP-1 α , das von Myelomzellen sezerniert wird, als auch von RANKL, das von den Stromazellen gebildet wird, zur Proliferation angeregt. Auch an dieser Stelle zeigt sich die komplexe Verknüpfung des Netzwerkes. Die oben beschriebene Inhibierung der Osteoblasten führt automatisch zu einer geringeren Osteoprotegrinausschüttung. Osteoprotegrin hemmt als endogener Rezeptorantagonist die Wirkung von RANKL, so wird die Osteoklasten stimulierende Wirkung von RANKL noch potenziert (Harousseau and Moreau, 2009).

Des Weiteren führen VEGF und HGF (Abb.5) zu einer erhöhten Neoangiogenese, die essentiell für die Tumorausbreitung ist.

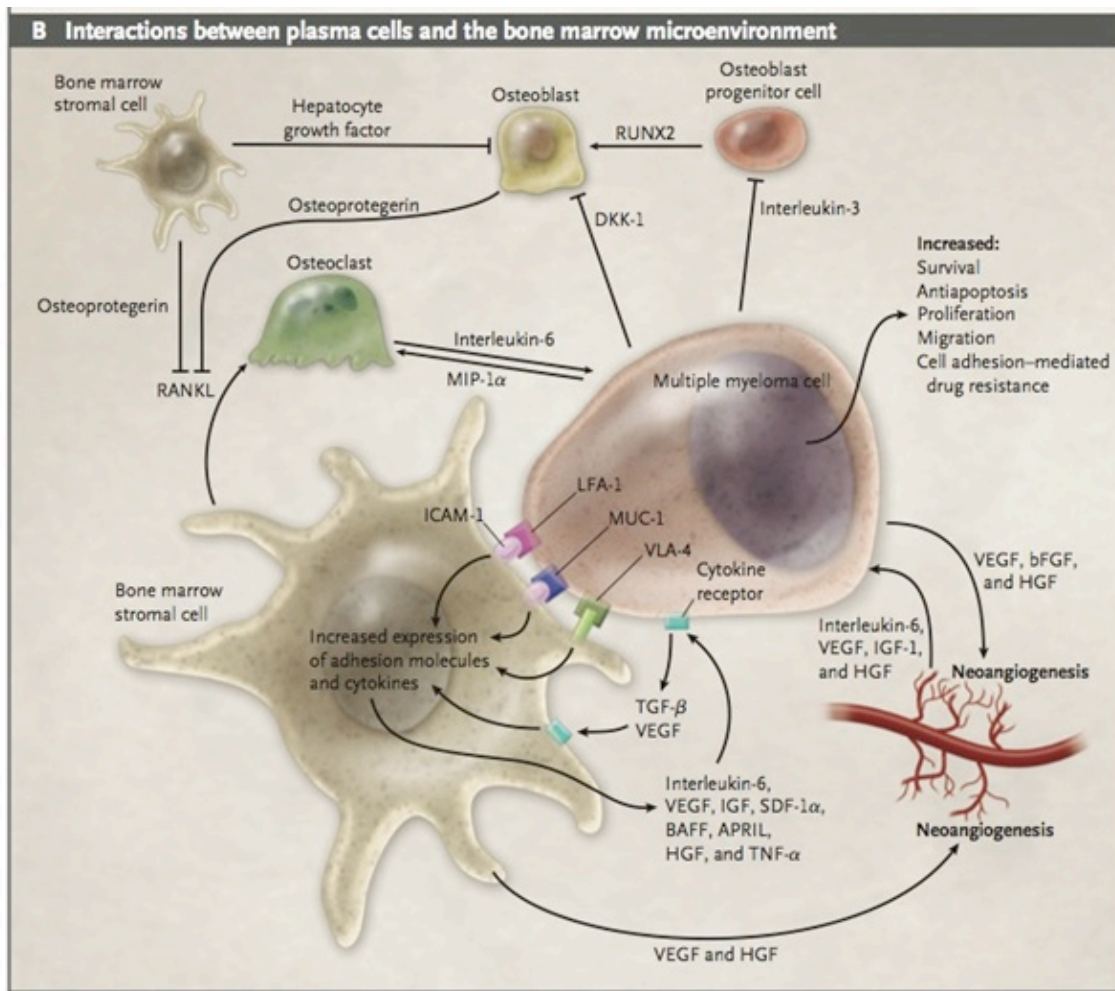


Abbildung 5:

Interaktion zwischen Plasmazellen und der Mikroumgebung des Knochenmarks
[aus Harousseau and Moreau, 2009]

Therapieansätze

Das Multiple Myelom ist eine unheilbare Krankheit. Es existieren jedoch verschiedene supportive und palliative Therapiemöglichkeiten, die eine möglichst stabile Remission mit langen progressionsfreien Remissionsintervallen bezwecken. Die meist multimodalen Behandlungsstrategien werden individuell an den Patienten und an dessen Allgemeinzustand angepasst (Goldschmidt, 2002).

Supportive Behandlungsmaßnahmen dienen der Verringerung von krankheitsbedingten Komplikationen wie beispielsweise nephroprotektive oder erythropoeseestimulierende Substanzen, als auch der besseren Therapieverträglichkeit durch adäquate Analgesie etc. (Kehrer et al., 2017).

Supportiv sowie präventiv sollte eine regelmäßige Verabreichung von Bisphosphonaten wie Pamidronaten oder Zoledronaten insbesondere bei Knochenläsionen erfolgen. Bisphosphonate verringern die Dysbalance von Knochenresorption und Knochenaufbau, indem sie die Osteoklastenfunktion hemmen (Singhal and Mehta, 2006). Dies verhindert die Entstehung/ Progression von Osteolysen und trägt zur Schmerzreduktion bei. Über einen längeren Zeitraum verabreicht hemmen sie jedoch zudem die Osteoblasten und können Knochennekrosen und vermehrt Frakturen verursachen (Eom et al., 2014). Eine lokale Strahlentherapie einzelner Knochenläsionen kann ebenfalls supportiv erwogen werden.

Das Grundkonzept der Therapie eines Multiplen Myeloms beinhaltet eine Hochdosischemotherapie (HDT) kombiniert mit autologer Blutstammzelltherapie (ASCT). In den letzten Jahren greift man zudem immer häufiger auf neue Substanzgruppen zurück, die eine gezielter Immuntherapie mit Antikörpern, Immunmodulatoren und Proteasomeninhibitoren ermöglichen (Kehrer et al., 2017).

Viele der herkömmlichen Chemotherapeutika sind im Bezug auf das Multiple Myelom unwirksam, weshalb die therapeutischen Maßnahmen sehr begrenzt sind. Ursächlich liegt diesem Problem zugrunde, dass sich ein Großteil der Plasmazellen nicht teilt und vom Zellzyklus abhängige zytotoxische Mittel deshalb nahezu ohne Effekt bleiben. Die entartete Myelomzelle hat aber auch verschiedene funktionelle und strukturelle Eigenschaften, die die Resistenz noch zusätzlich verstärken. So verhindert das von der

Myelomzelle produzierte Il-6 beispielsweise die Medikamenten-induzierte Apoptose. Transportproteine wie das p-Glycan, das MDR- relatet Protein (MRP), das low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) und das breast-cancer related protein (BCRP) transportieren Zytostatikamoleküle aus der Zelle hinaus und erhöhen so ebenfalls die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Weiterhin ist die Myelomzelle in der Lage, die Zytostatika effizient zu verstoffwechseln und Apoptose-induzierende Signalkaskaden zu stoppen (Harousseau and Moreau, 2009).

Die Therapie ist abhängig von der Möglichkeit zur autologen hämatopoetischen Stammzell- Transplantation (ASCT). Am Anfang der Behandlung eines aktiven intramedullären Multiplen Myeloms steht die *initiale Therapie*. Transplantationskandidaten erhalten hoch dosiert Dexamethason oder Methylprednisolon. Hier wird, falls möglich, auf alkylierende Chemoablation verzichtet, da dies den gesunden Stammzellen schadet und eine ASCT im späteren Verlauf erschwert. Patienten, die keine Kandidaten für autologe Blutstammzelltransplantation sind, werden oral mit Melphalan-Prednisolon behandelt.

Bei Versagen der initialen Therapie oder bei einem Rezidiv wird als nächster Schritt eine Therapie mit Hochdosischemotherapie (HDT) und anschließender autologer Blutstammzelltransplantation empfohlen. Alkylierende Chemotherapeutika wie Melphalan und Cyclophosphamide haben sich am wirksamsten erwiesen, da sie die geringsten Resistenzen aufweisen (Singhal and Mehta, 2006).

In den letzten Jahren wurden Wirkstoffe wie die Immunmodulatoren Thalidomid, und Lenalidomid, sowie Proteasomeninhibitoren wie Bortezomib und Carfilzomib zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingeführt. Sie können mit klassischen Chemotherapeutika und Glukokortikoiden kombiniert werden und gewinnen insbesondere bei komplizierten und refraktären Krankheitsverläufen immer höhere klinische Relevanz. Bortezomib und Co. haben den Therapieerfolg maßgeblich verbessert, indem sie das mediane Überleben, die Rate der kompletten Remissionen und die Zytoreduktion anheben. Vor allem Thalidomid aber auch neuere Proteasomeninhibitoren wie Bortezomib verursachen jedoch eine hohe therapieinduzierte Toxizität und erhöhen das Risiko für Komplikationen wie beispielsweise Thrombosen (Deleu et al., 2009; Kehler et al., 2017).

2.3 Bortezomib

Ein pathologischer Knochenstoffwechsel wie der Knochenschwund kommt bei vielen Knochenkrankheiten wie unter anderem dem Multiplen Myelom, der Osteoporose oder auch bei Knochenmetastasen vor. Die therapeutischen Möglichkeiten sind in diesem Bereich trotz zahlreicher innovativer Forschungsansätze aktuell noch sehr begrenzt und die verfügbaren Medikamente zeigen zum Teil nur geringe Wirkung. Innovative Medikamente wie Bortezomib haben großes therapeutisches Potential und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Bortezomib und ähnliche Proteasomeninhibitoren unterscheiden sich von bisher eingesetzten Therapeutika unter anderem durch ihre Wirkungsweise auf Stammzebene. Herkömmliche Medikamente zielen zumeist auf reife Zellpopulationen des Knochens ab. Es werden beispielsweise Bisphosphonate therapeutisch eingesetzt, die reife Osteoklasten hemmen. Murkherjee et al [2008] konnten hingegen in ihrer Studie darlegen, dass Bortezomib auf der Ebene undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen wirkt, während Osteoprogenitorzellen und reife Osteoblasten unempfindlich gegenüber Bortezomib sind. Die Wirkung auf Ebene der Stammzellen ermöglicht eine höhere Effizienz im Vergleich mit Medikamenten, die auf bereits differenzierte Zellen zielen. Bortezomib hemmt zudem die Osteoklastenaktivität und trägt so zur Unterdrückung osteolytischer Prozesse bei. Der folgende Teil der Arbeit stellt die Eigenschaften von Bortezomib und dessen charakteristische Wirkmechanismen auf den Knochenstoffwechsel dar.

Eigenschaften

Bortezomib, offiziell als PS-341 bekannt, ist eine Dipeptidyl-Boronsäure-Verbindung und gehört wie auch Thalidomide und Lenalidomide zu der Gruppe der Proteasomen-Inhibitoren. Proteasomen sind Enzymkomplexe, die über den Ubiquitin-Proteasom Signalweg zahlreiche regulatorische Enzyme und Transkriptionsfaktoren abbauen und eliminieren. Sie spielen infolgedessen eine große Rolle bei verschiedenen Vorgängen wie Apoptose, Zellteilung, zelluläre Adhäsion, Angiogenese und NF-KappaB-Aktivierung. In verschiedenen Studien konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, dass Proteasomen-Inhibitoren Tumorwachstum und die Bildung von Metastasen verringern (Jones et al., 2010).

Bortezomib ist ein hoch potenter selektiver Proteasomen-Inhibitor, der seit 2002 zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen ist und dessen klinische Wirksamkeit besonders in Bezug auf seinen positiven Effekt auf osteolytische Prozesse auch bei anderen malignen Neoplasien wie Kolon-, Lungen-, Pankreas-, Mamma- oder Prostatakarzinomen geprüft wird. Es reduziert die Tumormasse, das Tumorwachstum und osteolytische Läsionen über verschiedene Mechanismen. Bortezomib generiert bei Tumorzellen Apoptose und Nekrose, es inhibiert den Wnt Signalweg und den Matrixabbau und schließlich führt es zu einer Hemmung der Tumervaskularisierung (Whang et al., 2005).

Wirkung von Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel

Bortezomib zeigt komplexe Auswirkungen auf das Knochengewebe sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Umständen. Überwiegt im menschlichen Skelett der Knochenabbau resultiert daraus Knochenschwund, was mit Knochenschmerzen und pathologischen Frakturen einhergeht. Bortezomib verbessert einen solchen pathologischen Knochenmetabolismus.

Bortezomib hat einen positiven Effekt auf die Osteogenese und reduziert Osteolysen. Jones et al. [2010] konnten nachweisen, dass eine Therapie mit Bortezomib, bei mit Brustkrebszellen versetzten Mäusen, die Ausbildung von Osteolysen und Knochendestruktionen signifikant verminderte. Diese Ergebnisse sind zum einen auf die Interaktion von Bortezomib mit der entarteten Zelle zurückzuführen, die das Tumorwachstum hemmt und die Tumormasse reduziert (wie auch bei der Myelomzelle). Bortezomib beeinflusst aber zum anderen das Knochengewebe, indem es die Mikroumgebung verändert und so die Osteoblastendifferenzierung stimuliert und außerdem die Osteoklastenaktivität und Osteoklastenzahl senkt. Dies hat Auswirkungen auf das Knochenvolumen. Unter einer Therapie mit Bortezomib kommt es zu einem erhöhten Knochenvolumen und einer adäquat erhöhten Knochendichte durch gesteigerten trabekulären Knochenaufbau (Deleu et al., 2009; Murkerhejee et al., 2008).

Murkerhejee et al. [2008] konnten *in vivo* zeigen, dass Bortezomib sowohl im gesunden als auch beim osteoporotischen Knochen zu einer gesteigerten Mineralisation und Knochenbildungsrate (bone formation rate, BFR) führt. Unter einer Therapie mit

Bortezomib konnten erhöhte RUNX2- sowie Osteokalzin- Konzentrationen nachgewiesen werden, was diese Annahme unterstützt. Erhöhte RUNX2-Konzentrationen führen zu einer vermehrten Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten. RUNX2 aktiviert zudem Osteokalzin-Gene. Osteokalzin wird als ein potenter Marker der Knochenbildung angesehen und kann ebenfalls zur Beurteilung der Osteogenese genutzt werden. Nach einer niedrig dosierten Bortezomib-Behandlung kommt es zu signifikant erhöhten Osteokalzinwerten im Serum, was als Zeichen für eine vermehrte Osteogenese angesehen wird (Murkherjee et al., 2008; Jones et al., 2006).

Bortezomib wirkt außerdem anabol auf gesundes Knochengewebe. Präventiv verabreicht führte Bortezomib auch beim gesunden Knochen zu einem gesteigerten trabekulären Knochenaufbau und einer erhöhten Knochendichte (Jones et al., 2010).

Pharmakologische Wirkmechanismen

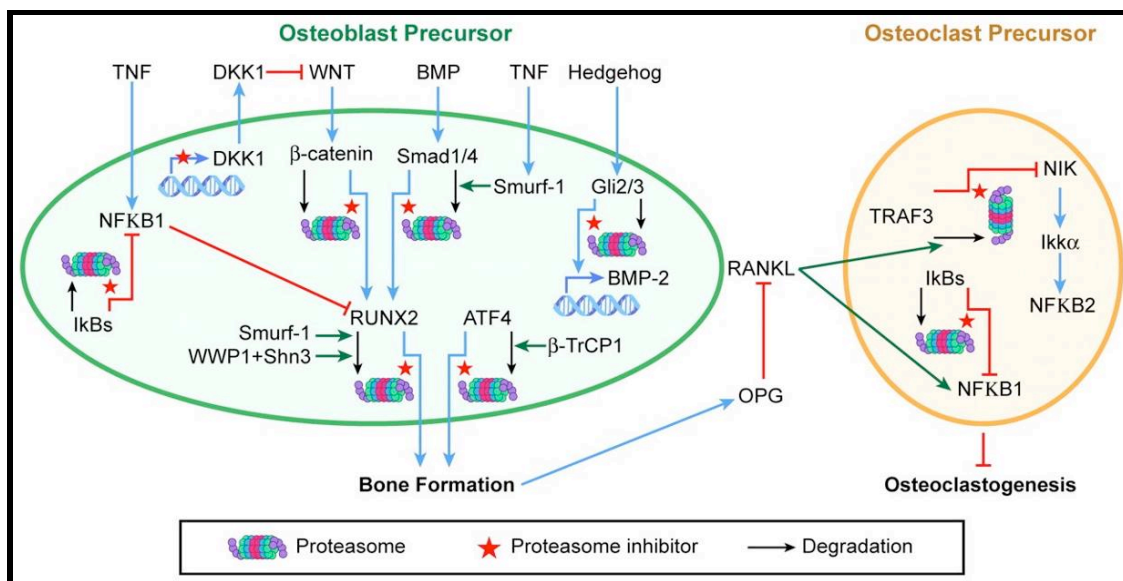


Abbildung 6:

Darstellung der Wirkmechanismen von Proteasomeninhibitoren auf Osteoblasten- und Osteoklastenprecursorzellen
[aus Yaccobi, 2010]

Wie bereits zuvor erwähnt, hemmen Proteasomen-Inhibitoren den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg, der an der Eliminierung intrazellulärer Proteine in allen eukaryontischen Zellen beteiligt ist. Beim Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg werden abzubauen Proteine mit einer Polyubiquitinkette markiert und dann innerhalb der Proteasen in kleinere Peptide abgebaut. Mithilfe dieses Metabolismus werden verschiedene Signalproteine wie Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressor Gene und Anti-Apoptose Proteine abgebaut. Über eine Regulation des beschriebenen Signalwegs beeinflussen Proteasomen somit maßgeblich den Zellzyklus, den programmierten Zelltod, aber auch zahlreiche metabolische Prozesse, wie die Osteoblastendifferenzierung und die Knochenbildung. Eine abnormale Proteasomen-Aktivität führt zu neoplastischem Wachstum und Metastasenbildung (Whang et al., 2005).

Bortezomib und andere Vertreter dieser Wirkstoffklasse fördern *in vitro* und *in vivo* die Anzahl, Funktion und Genexpression von Osteoblasten (Abb. 6) und damit den Knochenaufbau über zahlreiche Mechanismen (Garrett et al., 2003; Giuliani et al., 2007).

An dieser Stelle wird beispielhaft die kanonische NF- κ B - Signaltransduktions-Kaskade differenziert erläutert: *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated cells* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Produktion von inflammatorischen Proteinen, Adhäsionsmolekülen und Anti-Apoptose Molekülen stimuliert und so Tumorphiliferation, Metastasenbildung und Chemoresistenz ermöglicht. Über den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg wird das Protein I κ Bs (inhibitor of NF-KappaB), das die Aktivität des NF- κ B hemmt, vermehrt abgebaut. Proteasomen-Inhibitoren verringern den Abbau des I κ Bs und damit die kanzerogene Wirkung des NF- κ B (Whang et al., 2005).

In Bezug auf den Knochenstoffwechsel bewirkt der oben beschriebene Signalweg über die Hemmung von RUNX2 durch NF κ B1 einen verminderten Knochenaufbau. Bortezomib unterbricht diese Signalkaskade, indem es den Abbau von I κ Bs blockiert. Daraus resultiert eine vermehrte RUNX2-Wirkung und somit eine gesteigerte Knochenbildung.

RUNX2, auch CBFA-1 genannt, ist ein essentieller Transkriptionsfaktor der Osteogenese. Er beeinflusst die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten und infolgedessen gleichermaßen die Knochenbildung. Bortezomib verhindert den Abbau der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und ATF4 durch verschiedene Adaptermoleküle wie Shn3 (Schnurri-3), WWP1 und β -TrCP1. Die Expression von RUNX2 wird außerdem durch BMP und Wnt/ β -catenin Signalwege induziert. An dieser Stelle bewirken Proteasomeninhibitoren einen verringerten Abbau von β -catenin und Smad1/4, die die Signalwege inaktivieren (Yaccoby, 2010).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Bortezomib die Expression von DKK-1 inhibiert. DKK-1 wirkt über einen Antagonismus des Wnt-Signalweg. Bortezomib vermindert so durch die Hemmung von DKK-1 die Blockierung des Wnt-Signalwegs. Dies führt zu einer Stimulation der Osteoblastendifferenzierung und Osteoblastenaktivität (Zhou et al., 2010; Pratap et al., 2010).

Wie bereits erwähnt, supprimiert Bortezomib die Osteoklastendifferenzierung und Osteoklastenaktivität. Dieser Effekt beruht unter anderem auf der Inhibierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B- Signalweges. Bortezomib verhindert den Abbau von TRAF3 und I κ Bs. TRAF3 hemmt den nicht kanonischen Signalweg über NF κ B2/p100 und I κ Bs wie bereits beschrieben den kanonischen (Abb. 6). Daraus resultiert eine verringerte Osteoklastogenese.

Die vermehrte Osteoblastenanzahl führt aber auch zu einer erhöhten Produktion von OPG, das wiederum RANKL antagonisiert und ebenfalls eine verminderte Osteoklastenaktivität bewirkt.

Nebenwirkungen

Der therapeutische Einsatzbereich von Proteasomen-Inhibitoren ist aufgrund ihrer systemischen Toxizität stark begrenzt. Vor allem eine lange Behandlungsdauer führt zu schwerwiegenden Nebenwirkungen. Kurze, niedrig dosierte Bortezomib-Applikationen sind demgegenüber wesentlich besser verträglich, da gesunde Zellen Zeit haben, sich zu erholen.

Häufige Nebenwirkungen sind gastrointestinale Symptome, periphere Neuropathie und zyklische Thrombozytopenie. Der Ausbruch einer peripheren Neuropathie ist eine

wichtige Ursache für die vorzeitige Unterbrechung oder sogar die Beendigung der Bortezomib-Therapie. Knapp 35% aller mit Bortezomib therapierten Patienten entwickeln eine periphere Neuropathie oder eine bereits bestehende verschlechtert sich. Einzelne Studien konnten jedoch zeigen, dass die durch Bortezomib induzierte periphere Neuropathie kumulativ, dosisabhängig und reversibel ist (Deleu et al., 2009).

Die Proteasomen-Inhibitoren sind infolgedessen eine vielversprechende neue Medikamentengruppe zur Therapie entarteter Zellen. Sie inhibieren den Abbau der beschriebenen Signalmoleküle, induzieren so Apoptose und verhindern Zellteilung. In Bezug auf ihre osteokonduktive Eigenschaft sind sie gerade für die regenerative Medizin von großer Bedeutung. Die lokale Applikation dieser Medikamentengruppe mit Hilfe sogenannter „Komposite“ (Biomaterial als Medikamententräger) im Rahmen einer wirksamen und verträglichen (biokompatiblen) Anwendung ist somit von hohem wissenschaftlichen Interesse.

3 Material und Methoden

3.1 *Prüfsubstanz: Mit Bortezomib funktionalisiertes Silikat/Kollagen-Xerogel*

Herstellung des Silikat/Kollagen-Xerogels

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein speziell entwickelter Zweiphasenverbundwerkstoff aus bovinem Kollagen und Silikat als Knochenersatzmaterial getestet. Dem Silikat/Kollagen-Xerogel wurden verschiedene definierte Bortezomib-Konzentrationen in homogener Verteilung zugesetzt. Dieser Werkstoff wurde von unseren Kooperationspartnern der Technischen Universität Dresden neu entwickelt.

Das Konzept des neuartigen Kompositmaterials beruht auf dem Sol-Gel-Prozess, der eine Möglichkeit bietet, auch mit niedrigen Temperaturen aus flüssigen Präkursoren (z.B: Alkoxysilane) ein festes Xerogel zu synthetisieren (Abb. 7).

Über eine Hydrolyse entsteht aus dem Präkursor Kieselsäure (Tetraethoxysilane [TEOS, 99 %, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland] in einem Verhältnis von 1:4 mit Wasser und 0,01 M HCl) die lösliche Form des Silikats. Diese wird zur Herstellung des Kompositmaterials mit Kollagen, das als hochkonzentrierte Suspension in neutralem TrisHCl-Puffer (0,1 M TrisHCl pH 7,4 [Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland]) eingebettet ist, zu einer homogenen Suspension mit 30mg/ml Kollagen vereint. Hierfür wird zuvor bovines Tropokollagen Typ I gegen deionisiertes Wasser dialysiert (MWCO 12-14 kDa, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und mit einer 30 mM neutralem Natriumphosphat-Pufferlösung versetzt.

Als Zwischenprodukt entsteht durch Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten eine in das Silikat-Netzwerk eingelagerte Flüssigkeitsphase, die als Hydrogel bezeichnet wird. Infolge einer anschließenden Sublimationstrocknung (Christ Apha1-4 Labor-Gefriertrockner, Deutschland) verdunstet die flüssige Phase des Hydrogels und es resultiert ein kompaktes Xerogel (Heinemann, 2011a).

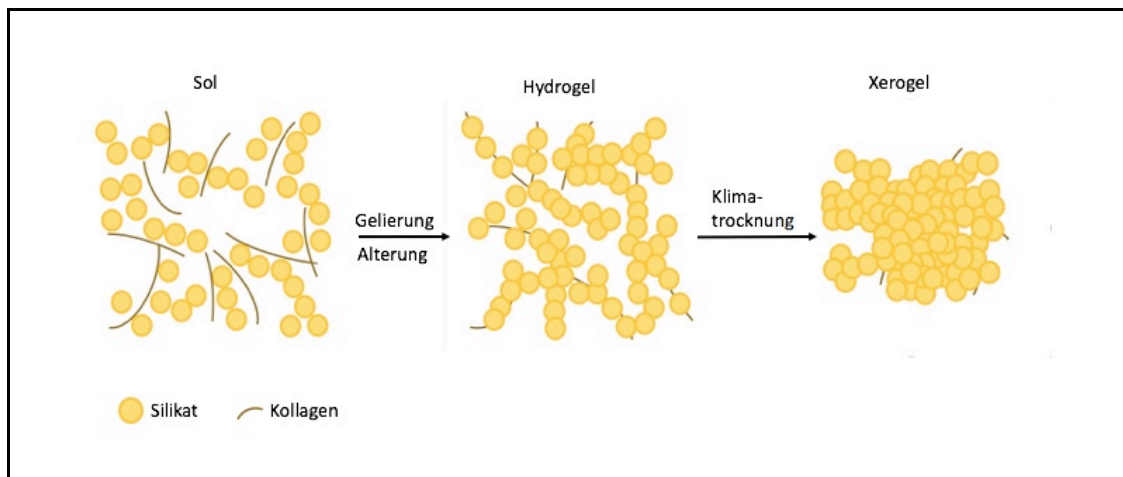


Abbildung 7:

Schematische Darstellung der Herstellung eines Xerogels: Ein Sol-Gel Prozess führt zur Reaktion der Ausgangskomponenten (kolloidales Silikat, fibrilläres Kollagen, Calciumphosphat) zum Zwischenprodukt Komposit-Hydrogel und schließlich zum Endprodukt Komposit-Xerogel (vgl. Heinemann, 2011a).

Zusammensetzung und Eigenschaften des Silikat/Kollagen-Xerogels

Das Verhältnis der einzelnen Komponenten des innovativen Knochenersatzmaterials basiert auf den Eigenschaften des humanen Knochengewebes. Knochengewebe besteht zu zwei Dritteln aus anorganischer Knochenmatrix in Form von mineralisierten Bestandteilen, wie Kalziumphosphaten und zu einem Drittel aus organischen Kollagenfibrillen. Dieses Prinzip imitierend beinhaltet das Biomaterial 70% Silikat und 30% Kollagen. Heinemann et al. [2009] konnten zeigen, dass die Verbindung von anorganischen und organischen Biomaterialien von Vorteil ist, da rein anorganische Materialien wie beispielsweise CPC (Calciumphosphatzement) zwar eine hohe Druckfestigkeit aufweisen, aber andererseits auch sehr steif sind und schnell brechen.

Das hier verwendete Kompositmaterial besteht aus anorganischen und organischen Bestandteilen, die miteinander verbunden sind und so verbesserte synergistische Eigenschaften aufweisen. Die anorganischen Bestandteile (Silikat) dienen als Strukturphase und erhöhen die Druckfestigkeit des Materials. In die Strukturphase eingebettet ist die Matrixphase, die aus organischem Kollagen besteht und die

anorganischen Bestandteile miteinander verbindet, was die Elastizität sowie die Zug- und Bruchfestigkeit erhöht (Dorozhkin, 2009; Rezwan et al., 2006; Radin et al., 2002). Das optimale Mengenverhältnis der einzelnen Bestandteile ist essentiell, da es sowohl die mechanischen als auch die chemischen Eigenschaften des Knochenersatzmaterials beeinflusst. Bei Silikatanteilen unter 40% nimmt der Xerogelcharakter des Materials ab, ist dagegen der Kollagenanteil zu gering, wirkt sich dies wiederum negativ auf die Elastizität aus (Heinemann, 2011a).

Das hier verwendete zweiphasige Komposit zeigt *in vitro* eine gute Biokompatibilität. Zellkulturuntersuchungen direkt auf Silikat/Kollagen/-Xerogelen belegen eine stimulierende Wirkung des Materials auf Knochenremodellierungsprozesse. Die Untersuchungen zeigen, dass es auf dem Xerogel zu einer Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten und von humanen Monozyten in Osteoklasten kommt. Die Degradation des Xerogels führt zur Freisetzung der einzelnen Komponenten. Kollagen und aus der Kieselsäure freigesetztes Silikat stimulieren die Zellfunktionen. Auch dokumentieren erste *in vivo*-Untersuchungen der Kompositxerogele (70% Silikat / 30% bovines Kollagen) positive Ergebnisse in Bezug auf die Biokompatibilität des Materials (Cheng et al., 2014; Heinemann et al., 2007b). Bei mit Silikat substituierten Knochenersatzmaterialien weisen verschiedene Studien einen osteokonduktiven Effekt des Silikats nach. Silikat und dessen Degradationsprodukte stimulieren die Knochenformation durch eine gesteigerte Kollagensynthese, eine erhöhte Mineralisation und eine vermehrte Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren. Über eine erhöhte Expression Osteoblastenspezifischer Markergene wie Osteokalcin, kommt es zudem zu einer gesteigerten Osteoblastenproliferation (Pietak et al., 2007; Reffitt et al., 2003).

Silikat/Kollagen-Xerogel mit beigefügtem Bortezomib

Wie in Abschnitt 3.2 näher erläutert, bekam ein Teil des Tierkollektivs im Zuge dieser Arbeit das hier beschriebene Xerogel mit zusätzlich beigefügten definierten Bortezomibkonzentrationen implantiert.

Hierfür wurde in Wasser gelöstes Bortezomib (Velcade®: Janssen-Cilag International NV, Beerse, Belgien) in unterschiedlicher Konzentration, der Kollagensuspension zugesetzt. Diese wurde dann mit zuvor berechneten Mengen Kieselsäure vermischt

und es setzte der bereits beschriebene Sol-Gel-Prozess ein, der eine homogene Verteilung des Wirkstoffes im Probenvolumen ermöglichte. Das so entstandene Hydrogel bestehend aus 30% Kollagen und 70% Silikat enthielt je nach Versuchsgruppe 100 µg (Versuchsgruppe 3), 500 µg (Versuchsgruppe 4) oder 2500 µg (Versuchsgruppe 5) Bortezomib. Nach Gelstabilisierung (3Tage) und Klimatrocknung (7 Tage in einem Klimatrockner (Espec SH 221, Japan) bei 37 ° C und 95% relativer Feuchtigkeit) entstand ein stabiles Xerogel (Durchmesser: 5 mm, Höhe: 3 mm) mit eingebettetem Wirkstoff. Diese wurden schließlich pulverisiert (Teilchengröße 250-710 µm) und mit 25 kGy gamma-sterilisiert.

Verschiedene Versuche unserer Kooperationspartner in Dresden zeigten, dass es zu einer kontinuierlichen Wirkstofffreisetzung des Bortezomibs (nach 14 Tagen etwa 60%) aus dem Xerogel ins Inkubationsmedium kommt. Die Ergebnisse belegten zudem, dass das freigesetzte Bortezomib die gewünschte inhibierende Wirkung auf die Zellviabilität von Myelomzellen aufweist.

Die Herstellung mittels der Sol-Gel-Technik macht das Xerogel somit zu einem potenten Drug- Delivery-System.

3.2 Versuchstiere und Zeitplan des Tierversuchs

Versuchstiere

Das Versuchsvorhaben wurde am 26.03.2013 nach §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes nach der aktuellen Fassung (Juli 2011) beim zuständigen Regierungspräsidenten vorgelegt und von diesem in der vorliegenden Fassung genehmigt.

Als Versuchstiere wurden weibliche, 120 Tage alte Ratten (Sprague Dawley [CrI:CD(SD)]) (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) ausgewählt, um aussagekräftige Untersuchungsergebnisse insbesondere in Bezug auf die Biokompatibilität und die Defektheilung ermitteln zu können. Die Implantation des Biomaterials in ein Wirbeltier ermöglichte eine adäquate Darstellung der Gesamtkörperreaktion auf das Implantat und der damit verbundenen komplexen Reaktionen.

Im Rahmen der hier zu untersuchenden Fragestellung erhielten insgesamt 40 Ratten unter Narkose eine Operation des linken distalen Femurs. Mithilfe eines Bohrlochs

wurde ein im Durchmesser 2,5 mm großer und 4 mm tiefer kreisförmiger Knochendefekt im Bereich der Metaphyse des lateralen Femurkondylus geschaffen. Die Ratten wurden in 5 Gruppen à 8 Tiere aufgeteilt. Dabei fungierte eine Gruppe mit einem 2,5 mm großer und 4 mm tiefen kreisförmigen Leerdefekt als Negativkontrolle. Den restlichen vier Gruppen wurden vier verschiedene Biomaterialien in den Knochendefekt implantiert. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, erhielt Gruppe 1 einen Leerdefekt, Gruppe 2 ein reines Silikat/Kollagen-Xerogel und Gruppe 3 bis Gruppe 5 ein Silikat/Kollagen-Xerogel, welches mit unterschiedlich hohen Konzentrationen Bortezomib versetzt worden war. Die Tiere wurden randomisiert und per Zufall den unterschiedlichen Versuchsgruppen zugeteilt.

Gruppe	Implantat	Anzahl der Tiere
1	Leerdefekt	8
2	Xerogel-Granulat	8
3	Xerogel-Granulat + Bortezomib (100µg/g)	8
4	Xerogel-Granulat + Bortezomib (500µg/g)	8
5	Xerogel-Granulat + Bortezomib (2500µg/g)	8

Tabelle 1: Einteilung der Versuchstiere in verschiedene Gruppen mit jeweils zugehörigem Implantat

Zeitplan des Tierversuchs

Der zeitliche Ablauf des Versuchs ist in Tabelle 2 schematisch dargestellt. Die Ratten wurden im Alter von 120 Tagen zunächst 10 Tage im Tierstall der Zentralen Forschungseinrichtung am Klinikum der Johann-Wolfgang Goethe-Universität eingestellt. Die Unterbringung der Tiere erfolgte artgerecht in einem für Labortiere ausgestatteten klimatisierten Tierstall in Makrolonkäfigen TYP III bzw. Typ IV mit erhöhten Käfigdeckeln.

Nach der Einstellung erfolgte am Versuchstag 0 die Operation des linken Femurs unter Narkose und adäquater Analgesie. Am 30. Versuchstag wurden die Tiere in CO₂-Narkose euthanasiert und die operierten Femora wurden zur histologischen und immunhistologischen Untersuchung entnommen und markiert. Post mortem wurden die Tierkörper fachgerecht in einer Tierbeseitigungsanlage entsorgt.

Die Behandlung und Nachsorge wurde durch das ausgebildete Fachpersonal der zentralen Forschungseinrichtung gewährleistet. Tierhaltung, Operationen und Nachbeobachtungen bis zur abschließenden CO₂-Euthanasie unterlagen veterinärmedizinischer Kontrolle.

Alter der Tiere	Versuchszeitpunkt	Anzahl der Tiere	Maßnahmen
120 Tage	-	40	Einstellen der Tiere
130 Tage	Tag 0	40	Narkose + OP am Femur
160 Tage	Tag 30	40	Narkose + Euthanasie für Histologie

Tabelle 2: Zeitplan des Tierversuchs

3.3 Operation, Nachbehandlung und Euthanasie

Narkose

Für die Narkose wurde eine Inhalationsnarkose verwendet. Die Narkose wurde mit Inhalation eines Isofluran Sauerstoffgemisches (4 vol.% Isofluran: Baxter Deutschland GmbH, Nr. 06497131, Unterschleißheim, Deutschland) eingeleitet und für die Dauer der Operation mit 0,8-1 vol.% Isofluran aufrechterhalten. Zur Analgesie erhielten die Tiere direkt nach der Narkoseeinleitung 0,02 mg/kgKG Buprenovet® (Buprenorphin: Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland).

Operation

Jedem Versuchstier wurde unter Vollnarkose am linken distalen Femur ein metaphysärer Knochendefekt gesetzt (Abb 7 B-G). Der kontralaterale Femur blieb unberührt. Hierfür wurde zunächst in Rechtsseitenlage und unter Fixierung der linken Extremität am Operationstisch die Haut im Bereich des distalen linken Femurs und der proximalen Tibia großflächig rasiert (Einmalrasierer, Wilkinson, Nr. 370-600, Solingen Deutschland) und mit Braunol® (B. Braun Melsungen AG, Nr. 1588716, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Danach wurde der Operationsbereich mit sterilen Tüchern abgedeckt. Während der gesamten Operation wurde absolute Sterilität eingehalten, um eine Kontamination zu verhindern.

Im folgenden Schritt wurde mithilfe einer longitudinalen 3 cm langen Hautinzision die Kutis und Subkutis am distalen Femur lateral vom mittleren Oberschenkel bis zum Kniegelenk durchtrennt. Anschließend erfolgte die Spaltung der Fascia lata und der Muskulatur zwischen dem Musculus biceps femoris und dem Musculus vastus lateralis femoris auf gleicher Höhe. So gelang die Darstellung des knöchernen Femurs.

Unter Sicht auf den knöchernen Femur konnte nun mittels eines im Durchmesser 2,5 mm großen Bohrers unter Wasserkühlung ein 4 mm tiefer kreisförmiger Defekt im Bereich des lateralen Femurkondylus geschaffen werden. Der Defekt wurde anhand der Randomisierungsliste entweder leer belassen (Gruppe1: Kontrollgruppe) oder mit dem entsprechen Biomaterial (Gruppe 2-5) aufgefüllt.

Nach Setzen des Knochendefekts erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss mit Hautverschluss durch Wundklammern. Zusätzlich wurde die Operationswunde mit Nobecutan-Spray® (Inibsa-Pharma Slovensko, Nr. 336644, Bratislava, Slowakai) verschlossen.

Postoperative Überwachung

Die Ratten wurden bis zum Wiedererlangen des vollen Bewusstseins in einer Aufwachbox untergebracht, in der eine warme und leicht kontrollierbare Umgebung herrschte. Die Tiere wurden in der darauffolgenden Woche einzeln gehalten, um zu

verhindern, dass sie sich unter Schmerzmedikation gegenseitig verletzten. Im Anschluss daran konnten sie wieder in ihren ursprünglichen Gruppen im Typ IV Käfig mit erhöhten Deckeln versorgt werden.

In den ersten 5-7 Tagen postoperativ kam es aufgrund des Muskel- und Fasziendefeks während der Operation zu Muskel-, Faszien- und Periostschmerzen. Bis zum 7. postoperativem Tag erfolgte zur Schmerzlinderung alle 12 Stunden eine Therapie mit Buprenovet® 0,02mg/kgKG s.c.. Die Knochenersatzmaterialien führten zu keinen auffälligen schmerzauslösenden oder sonstigen Nebenwirkungen. Eine Vollbelastung der operierten Extremität konnte direkt postoperativ beobachtet werden.

Während des gesamten Beobachtungszeitraums unterlagen die Tiere einer engmaschigen Betreuung und Überwachung durch das Fachpersonal der zentralen Forschungseinrichtung. Tierärzten und Tierpflegern beurteilten und dokumentierten täglich das Verhalten, das Allgemeinbefinden, die Futteraufnahme und das Körpergewicht der Tiere. Sie achteten besonders auf den Heilungsverlauf der Operationswunde, die Bewegungsaktivität und den Bewegungsablauf.

Euthanasie

Im Alter von 160 Tagen und somit 30 Tage nach der Femur-Operation wurden alle Tiere schmerzlos in CO₂-Narkose euthanasiert. Im Anschluss an die Euthanasie wurden die operierten Femora von Weichteil- und Bänderresten freipräpariert.

Die Implantationsstelle der verschiedenen Biomaterialien, als auch der Leerdefekt waren nach Entfernung des Weichteilgewebes makroskopisch noch leicht erkennbar. Es zeigte sich bei fast allen Tieren ein knöcherner Umbau im ehemaligen Defektbereich, die Biomaterialien waren mit bloßem Auge kaum noch ersichtlich. Eine Implantatlockerung oder Zeichen einer abgelaufenen Implantatinfektion konnten bei keinem der Tiere festgestellt werden.

Die Femora wurden für die weitere Bearbeitung für immunhistologische und histologische Untersuchungen in 4% neutral gepuffertem Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich GmbH, Nr. 30525-89-4, Taufkirchen, Deutschland) fixiert.

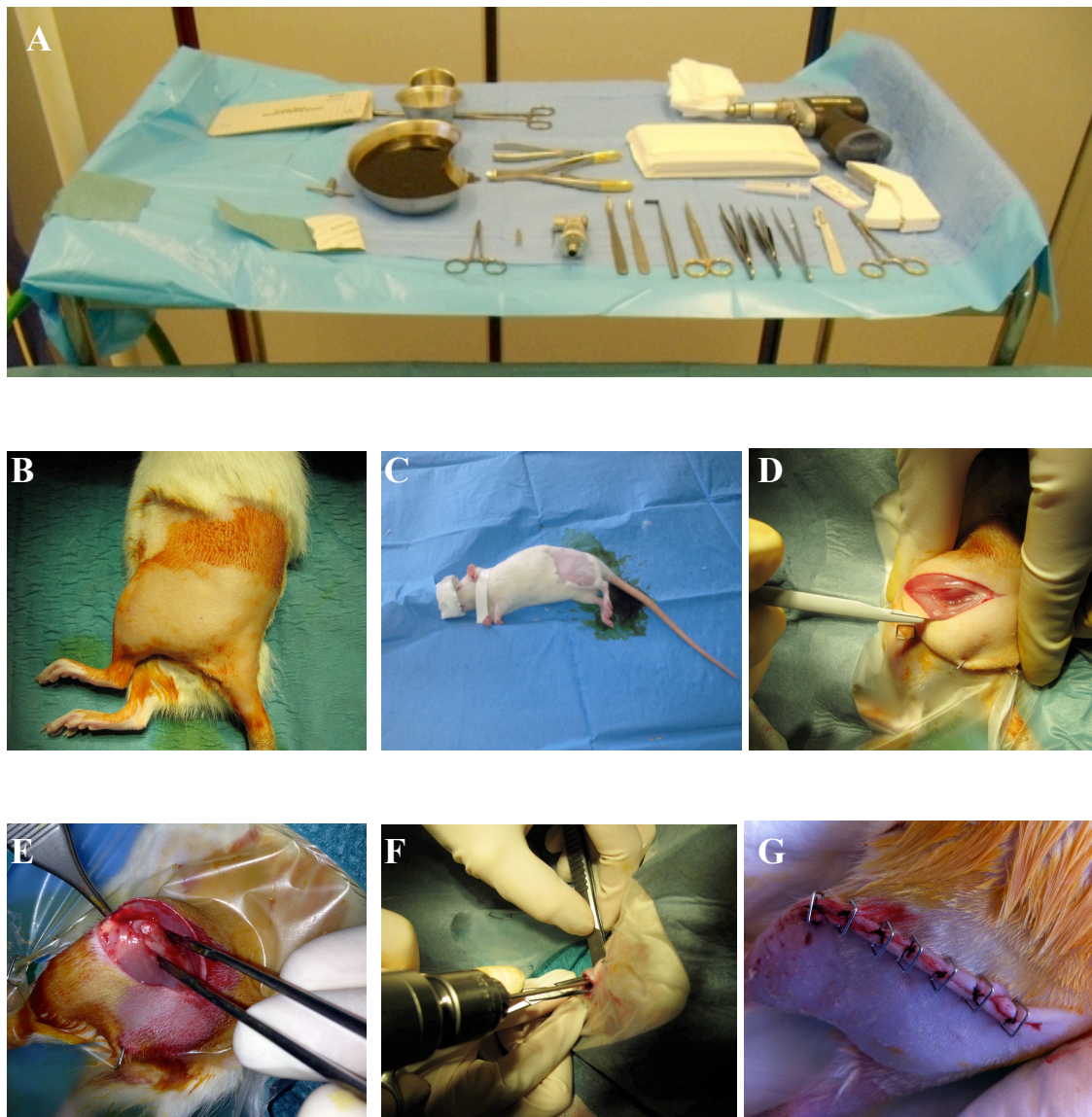


Abbildung 8: Operationsmethode

A: Übersicht der verwendeten OP-Instrumente

B-E: Unter Narkose erfolgte eine großflächige Rasur des distalen linken Femurs sowie der proximalen Tibia (B). Nach Rechtsseitenlagerung (C), Fixierung der Extremität und Desinfektion wurde eine mediale Inzision zur Darstellung des distalen Femurs vorgenommen (D-E). Der metaphysäre Knochendefekt wurde mithilfe eines Bohrlochdefekts (F) gesetzt und je nach Gruppe mit Biomaterial aufgefüllt oder leer belassen (Kontrollgruppe). Schließlich wurde die Wunde mithilfe einer Klammernaht und Nobecutan-Spray® verschlossen.

3.4 Herstellung der Technovit 9100 Schnitte

Die Gewebeaufbereitung, die Herstellung der Schnitte, die enzymhistochemischen Versuche, die immunhistochemische Diagnostik sowie die MOVAT-Färbungen erfolgten im Laboratorium für experimentelle Unfallchirurgie der Justus -Liebig-Universität Gießen. Für die Einbettung wurde das Kunststoffeинbettssystem Technovit®9100 neu (Heraeus Kulzer GmbH, Nr. 64715444, Wehrheim, Deutschland) verwendet. Technovit®9100 neu ist ein kaltpolymerisierender Kunststoff auf Basis von Methylmethacrylat, der speziell für die Einbettung von mineralisiertem Gewebe entwickelt wurde. Der Vorteil dieser Kunststoffeинbettung liegt unter anderem darin, dass hiermit gleichmäßig dicke Schnitte angefertigt werden können, die sich für enzym- und immunhistologische Untersuchungen eignen. Zudem bleiben hiermit morphologische Details der Mineralmatrix, knorpelige und ligamentöse Gewebe gut erhalten (unter:

http://kulzertechnik.de/de/maerkte_1/histologie/produktbereiche_1/polymerisationssysteme_1/technovit_9100.aspx, abgerufen am 30.04.2016).

Protokoll der Technovit 9100 Einbettung

Die Kunststoffeинbettung erfolgte gemäß dem Protokoll (siehe Tabelle 3) in verschiedenen Schritten, die nun kurz dargestellt werden.

Die Femora sind zunächst in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert worden. Die Fixierung ermöglichte eine Strukturstabilisierung, indem autolytische Zellvorgänge durch Proteindenaturierungen gestoppt wurden. Im Anschluss erfolgte die Spülung der entnommenen Gewebe in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer mit einem pH von 7,2 bis 7,4. Die fixierten und gespülten Femora wurden dann oberhalb der distalen Metaphyse geteilt und der proximale Teil verworfen. Die distalen Abschnitte der Femora wurden komplett in Technovit eingebettet. Die Entwässerungs- und Infiltrationsdauer wurde je nach Probengröße angepasst.

Lösung	Temperatur	Zeit; Rütteln
70 % Ethanol	Raumtemperatur	2 Tage
80 % Ethanol	Raumtemperatur	3 Tage
96 % Ethanol	Raumtemperatur	2 Tage
100 % Ethanol	Raumtemperatur	2x je 3 Tage 1x 2 Tage
100 % p.A. Ethanol	Raumtemperatur	1 Tag
Xylol	Raumtemperatur	2x je 12 Stunden
Präinfiltration 1	Raumtemperatur	3 Tage
Präinfiltration 2	Raumtemperatur	2 Tage
Präinfiltration 3	+ 4 °C	3 Tage
Infiltration	+ 4 °C	6 Tage
Polymerisation	- 4 °C	2 Tage
	+ 4 °C	1 Stunde

Tabelle 3: Zeitplan der Technovit 9100 - Einbettung

Vorbereitung der Komponenten

1. Entstabilisieren der Basislösung

Chromatographiesäule mit 50 g Al₂O₃ füllen und langsam Technivot 9100 NEU-Basislösung (Heraeus Kulzer GmbH, Nr. 66006735, Wehrheim, Deutschland) durchlaufen lassen. Eine Säulenfüllung mit Al₂O₃ reicht zur Entstabilisierung von 3 - 4 Litern Basislösung. Die entstabilisierte Lösung bei + 4°C für die laufende Verarbeitung gelagert.

2. Herstellung der Gebrauchslösungen

Präinfiltration 1: Basislösung und Xylol im Verhältnis 1:1 mischen.

Präinfiltration 2: 250 ml Basislösung + 1,25 g Härter 1 (Heraeus Kulzer GmbH, Nr. 64709022, Wehrheim, Deutschland)

Präinfiltration 3: 250 ml Basislösung + 1,25 g Härter 1

Infiltration: 250 ml Basislösung + 20 g PMMA (Heraeus Kulzer GmbH, Nr. 66010251, Wehrheim, Deutschland) + 1 g Härter 1

Polymerisation: 9 Volumenteile Stammlösung A + 1 Volumenteil Stammlösung B

Stammlösung A: 500 ml Basislösung + 80 g PMMA + 3 g Härter 1

Stammlösung B: 44 ml Basislösung + 4 ml Härter 2 (Heraeus Kulzer GmbH, Nr. 66010251, Wehrheim, Deutschland) + 2ml Polymerisationsregler (Heraeus Kulzer GmbH, Nr. 66039184, Wehrheim, Deutschland)

Weiterverarbeitung:

Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Proben langsam auf Raumtemperatur temperiert. Unter dem Abzug konnten dann, nach Entfernung des Parafilms, die Blöcke aus den Formen gedrückt werden und für die Weiterverarbeitung in geeignete Größen gesägt werden. Nachfolgend wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica Biosystems, RM2255, Nussloch, Deutschland), nach Erreichen des Defektbereiches, Sagittalschnitte von lateral nach medial bei einer Schnittdicke von 5 µm hergestellt. Um zu verhindern, dass das Implantat beim Schneidevorgang aus dem Knochen herausfällt, wurde Kawamoto-Folie (Tadafumi Kawamoto PUD, Nr. C-FP095, Konandai Konan-Ku,

Yokahama Japan) vor jedem Schnitt auf den eingespannten Technovit-Block gelegt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Folie mit dem aufliegenden Schnitt auf einem Glasobjektträger über doppelseitig klebende Folie (Plano GmbH, Nr. G3349B, Wetzlar, Deutschland).

3.5 Standardfärbungen

MOVAT Färbung

Die MOVAT-Pentachrome-Färbung wurde 1955 von Henry Zoltan Movat zur Charakterisierung von Bindegewebe entwickelt. Mit einer Färbung können hier die unterschiedlichen Komponenten des Bindegewebes farblich differenziert dargestellt werden. Die Färbung eignet sich für Übersichtsfärbungen und zur Differenzierung von mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Gewebe. Aufgrund kontrastreicher Färbungen können die einzelnen Gewebekomponenten gut unterschieden werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die MOVAT-Pentachrome Färbung durchgeführt, um die Knochenoberfläche (mm^2) und die Bindegewebsfläche (mm^2) quantitativ bestimmen zu können und sie so in Relation zueinander beurteilen zu können. Auch diente die MOVAT- Färbung der Darstellung der Inflammationszone und schließlich dem Vergleich der unterschiedlichen Implantat Retentionen.

Versuchsdurchführung:

Für die Durchführung der MOVAT-Färbung wurden die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entplastet und daraufhin für 40 Minuten in Alcianblau-Lösung (Chroma/ Waldeck GmbH & Co Kg, Nr. 1A-288, Münster, Deutschland) gelegt. Im Anschluss wurden die Schnitte für 60 Minuten in alkalischem Ethanol inkubiert und mit destilliertem Wasser gespült. Nun wurden die Präparate mit Weigert's Eisenhämatoxylin (Lösung A [Carl Roth GmbH, Nr. X906.1, Karlsruhe, Deutschland] im Verhältnis 1:1 mit Lösung B [Carl Roth GmbH, Nr. X907, Karlsruhe, Deutschland] mischen) für 14 Minuten gefärbt und danach gespült. Eine erneute Färbung wurde mit Brilliant Crocein-Fuchsin Lösung für 6 Minuten verrichtet. Das hier verwendete Färbemittel wurde aus Komponente A (0,1g Brilliant Crocein R [Chroma/ Waldeck GmbH & Co Kg, Nr. 1B109, Münster, Deutschland] in 99,5 ml dest.

H₂O; anschließend 0,5ml Essigsäure hinzugeben) und Komponenten B (0,1g Fuchsinäure [Merck, Nr. 7629, Darmstadt, Deutschland] in 99,5 ml dest. H₂O; anschließend 0,5ml Essigsäure hinzugeben) im Verhältnis 5:1 hergestellt.

Die Schnitte wurden mittels einer Lösung bestehend aus 5g Phosphormolibdänsäure (5% Phosphorwolframsäure [Merck, Nr. 1.00583.0250, Darmstadt, Deutschland]) und 100ml destilliertem Wasser für 9 Minuten entfärbt. Sowohl vor als auch nach der Färbung wurde eine Spülung mit 0,5 % Essigsäure (Eisessig [Merck, Nr. 1.00063.1000, Darmstadt, Deutschland] in dest. H₂O) in destilliertem Wasser vorgenommen. Vor der Färbung wurden die Schnitte eine Minute lang und nach der Färbung 40 Minuten lang unter Schütteln gespült. Schließlich wurden die Präparate mit Ethanol (Ethanol 522 mit 1% Petroläther [Stockmeier Holding GmbH, Nr. 1001043227002, Bielefeld, Deutschland]) und Xylol (Carl Roth GmbH, Nr. 9713.3 Karlsruhe, Deutschland) entwässert und mit Eukitt (Sigma-Aldrich GmbH, Nr. 03989, Taufkirchen, Deutschland) und einem Deckglas eingedeckelt.

Toluidin-Blau Färbung

Die Toluidin-Blau Färbung ist eine Standardfärbung für histologische Untersuchungen des Knochengewebes. Sie diente der morphologischen Untersuchung des ehemaligen Defektbereichs.

Die Präparate wurden gemäß dem folgenden Protokoll mit Toluidin-Blau, hergestellt aus 8 g Natrium Tetraborate (Merck, Nr. 1.06306.0250, Darmstadt, Deutschland) in 8 g Toluidine Blau O (Chroma/ Waldeck GmbH & Co Kg, Nr. 1B 481, Münster, Deutschland) sowie 2 g Pyronin G (Merck, Nr. 7518, Darmstadt, Deutschland), angefärbt.

	Lösung	Temperatur und Zeit
Entplasten	MEA	3 x 5 min bei RT ¹
	Ethanol 100%, 96%, 80%, 70%	je 5 min bei RT
Spülen	Destilliertes Aqua	2 x 5 min bei RT

Färbung	Toluidin-Blau	10 sec
Entwässern	Ethanol 70%, 96%, 100%	Je 5 min bei RT
	Xylol	2 x je 5 min
Eindeckeln	DePeX ²	

¹ Raumtemperatur

² (SERVA Electrophoresis GmbH, Nr. 18243, Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 4: Protokoll der Toluidin-Blau Färbung

3.6 Enzymhistochemische Untersuchungen

Die Enzymhistochemie dient dem Nachweis verschiedener Enzyme, beziehungsweise deren enzymatischer Aktivität und stellt so Stoffwechselvorgänge in Zellen und Zellstrukturen dar. Hierfür wurden die Präparate mit einem wasserlöslichen Substrat inkubiert, das durch die Enzymreaktion zu einem oder mehreren unlöslichen und damit farbigen Produkten umgewandelt wurde (Aescht et al., 2010).

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Enzyme nachgewiesen. Zum einen die Alkalische Phosphatase und zum anderen die Tartrat-resistente saure Phosphatase.

Alkalische Phosphatase (AP)

Die Alkalische Phosphatase gehört zu der Enzymklasse der Phosphatasen, die Phosphatgruppen von einem Substrat abspalten und so die Kinasen antagonisieren. Die alkalische Phosphatase ist an der Zellmembran lokalisiert und katalysiert die hydrolytische Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure bei stark alkalischem pH-Optimum (pH 9,2 - 9,8). Die Alkalische Phosphatase ist im Periost, wo sie aktiv an der Knochenbildung beteiligt ist, in Gallenkanälchen der Leber, dem Dünndarm und in Blutkapillaren nachzuweisen (Aescht et al., 2010).

Im Bezug auf den Knochenstoffwechsel spielt die Alkalische Phosphatase eine ganz entscheidende Rolle. Sie ist an der Plasmamembran der Osteoblasten lokalisiert. Hier sorgt sie für die Bereitstellung hoher Konzentrationen anorganischen Phosphats durch

die Spaltung organischer Phosphate und Pyrophosphat. Das anorganische Phosphat wird wiederum mit Calcium zur Bildung von Calcium-Phosphat-Präzipitaten verwendet, die die Grundlage der Hydroxyapatit-Kristalle bilden. Die Aktivität der AP wird als ein Marker für die Osteoblastenfunktion und somit für die Mineralisation angesehen (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

Folgende Enzymreaktion führte zum Nachweis der Aktivität der alkalische Phosphatase: Nach der Entplastung der Technovitschnitte in MEA (2-Methoxyethylacetat [Merck, Nr. 8.06021.1000, Darmstadt, Deutschland]) erfolgte hinterher in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96% und 70% Ethanol) die Rehydrierung. Im Anschluss wurden die Schnitte in destilliertem Wasser und danach in 0,1Mol Trispuffer (Carl Roth GmbH, Nr. 4855.2, Karlsruhe, Deutschland) mit einem pH von 9,4 gespült. Die Inkubation der Schnitte mit dem Phosphatase-Substrat BCIP/NBT (KPL, Nr. 50-81-08, Gaithersburg, USA) erfolgte für zwei Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach Ablauf der zwei Stunden wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült und dann mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung (Carl Roth GmbH, Nr. N069.1, Karlsruhe, Deutschland) gegengefärbt. Schließlich wurde die Entwässerung mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) und Xylol durchgeführt. Das abschließende Eindeckeln erfolgte mit DePeX unter dem Abzug.

TRAP (tartrat-resistente saure Phosphatase)

Aescht et al. [2010] beschreiben die tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) als ein Enzym, welches im sauren Milieu die Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure mit verschiedenen Alkoholen und Phenolen katalysiert und generell als Marker für Lysosomen dient. Die Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, wird als Typ 5 saure Phosphatase beschrieben, die in Form von zwei Isoformen vorliegen kann. Die aktive und hier relevante Isoform 5a wird von Osteoklasten gebildet, während die inaktive Isoform 5b von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Während der Knochenresorption sezernieren Osteoklasten TRAP zur Spaltung von Phosphatesterbindungen. Bei einer erhöhten Knochenresorption kann eine äquivalent erhöhte TRAP Aktivität nachgewiesen werden, demzufolge fungiert TRAP als histochemischer Marker der Osteoklasten (da Silva et al., 2012; Hayman, 2008).

Für die Darstellung von TRAP wurden die Technovitschnitte ebenfalls in 2-Methoxyethylacetat entplastet und dann in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Für die darauffolgende Enzymreaktion wurden die Schnitte mit einer gemischten Färbelösung bedeckt. Färbelösung A wurde aus Naphthol-AS-TR-Phosphat und 125µl N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) hergestellt und Farblösung B aus di-Natriumtetrat-Dihydrid (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermischt mit Echtrotsalz (35g Fast Red TR Salt [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. 36.888-1 Taufkirchen, Deutschland]). Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Shandon Instant-Hämatoxylin [Thermo Fisher Scientific, Nr. 6765015, Darmstadt, Deutschland] 1+3 verdünnt in Aqua Bidest.). Nach dem Bläuen in Leitungswasser für 10 Minuten und einem Spülvorgang mit Aqua dest erfolgte die Eindeckelung mit der zuvor im Wasserbad verflüssigten Kaisers Glyceringelatine (Merck, Nr. 109242, Darmstadt, Deutschland).

3.7 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient der spezifischen Darstellung von Makromolekülen (Proteinen, Polysacchariden, Lipiden, Nukleinsäuren etc.) in Zellen und Geweben mithilfe von bindenden Antikörpern. Die Antikörper werden an Markersubstanzen konjugiert, die mithilfe eines Lichtmikroskops darstellbar sind oder über Färbereaktionen sichtbar gemacht werden. Man unterscheidet hierbei die direkte von der indirekten Immunmarkierung. Bei der direkten Immunmarkierung bindet ein Markermolekül direkt an den Antikörper, der spezifisch an das Antigen koppelt.

Bei der indirekten Methode bindet zunächst ein Primärantikörper spezifisch an das Antigen. Ein mit einem Nachweissystem konjugierter Sekundärantikörper bindet dann in einem weiteren Schritt an den Primärantikörper (Aesch et al., 2010; Sinowatz et al, 2000).

Im Rahmen dieser Studie wurden für die immunhistochemischen Färbungen das EnVision- System sowie das ABC-System verwendet. Beide Verfahren sind durch Weiterentwicklungen aus der indirekten Immunmarkierung entstanden (Abb. 9A, B). Die Avidin-Biotin Complex (ABC) Methode basiert auf die starke Affinität von Avidin gegenüber dem Vitamin Biotin (http://www.dako.com/de/08002_ihc_staining_methods.pdf).

Biotin ist mit dem Sekundärantikörper konjugiert und fungiert als Bindeglied zwischen gewebegebundenem Primärantikörper und einem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex. Avidin verfügt über vier Bindungsstellen für Biotin, dadurch entstehen gitterartige Komplexe, in denen das assoziierte Enzym nach Zugabe eines Substrates dieses oxidiert, worauf der Farbstoff an Ort und Stelle ausfällt und ein unlösliches Farbprodukt bildet (Hsu et al., 1981; Sternberger et al., 1970).

Der Vorteil des Verfahrens besteht in einer hohen Sensitivität, jedoch kommt es hierbei auch zu unspezifischen Bindungen, beispielsweise an lektinähnliche Gewebekomponenten, sowie zu einer Bindung mit im Gewebe enthaltenem endogenem Biotin. Die Bindung an endogenes Biotin und die daraus resultierende unerwünschte Hintergrundfärbung, kann in einem weiteren Schritt durch eine Blockung verringert werden.

Die auf Polymeren basierende Immunhistochemie, zu der das EnVision™ System zählt, versucht diese Nachteile auszugleichen (http://www.dako.com/de/08002_ihc_staining_methods.pdf). Hier wird für die indirekte Visualisierung ein Polymergrundgerüst genutzt, an das eine Vielzahl von Antikörpern und Enzymmolekülen konjugiert ist. An ein einzelnes Polymergrundgerüst können bis zu 70 Enzymmoleküle und über 10 Primärantikörper binden (Abb. 9 B).

Das EnVision™ System beinhaltet Sekundärantikörper, die spezifisch gegenüber einer Vielzahl an Gewebe gebundener Primärantikörper sind. Diese stammen von Mäusen oder Kaninchen ab. Ein Dextran Grundgerüst, an das viele Enzymmoleküle gebunden sind, ist an die Sekundärantikörpern konjugiert. Im Vergleich zu der vorgestellten ABC-Methode weist das EnVision™ System eine gesteigerte Spezifität auf, während die Sensitivität weiterhin ähnlich hoch ist (Chilosi et al., 1994; A and M.e, 1995; Sabattini et al., 1998).

Die Protokolle beider Verfahren sind tabellarisch am Ende des Kapitels aufgelistet. Bei jeder Färbung wurde zusätzlich ein Durchgang mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hier wurde der Primärantikörper durch einen Verdünnungspuffer ersetzt, um so eine unerwünschte Reaktion des Sekundärantikörpers und des jeweiligen Nachweissystems ausschließen zu können.

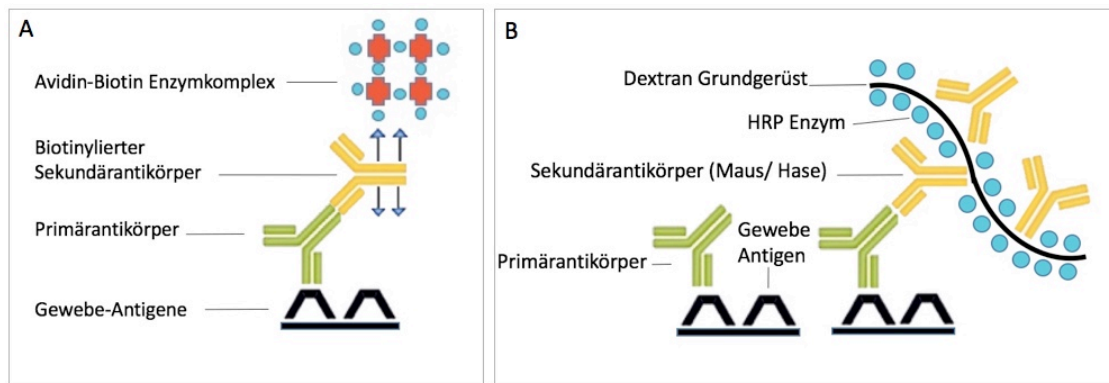


Abbildung 9:

A: Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode

B: das auf Polymeren basierende EnVision™ System

(vgl. http://www.dako.com/de/08002_ihc_staining_methods.pdf)

RANKL (ligand of receptor activator of nuclear Kappa-B)

Wie bereits in Kapitel 2.1 ausführlich beschrieben, ist RANKL ein membranständiges Protein, das von Osteoblasten gebildet wird und den RANK (receptor activator of nuclear Kappa-B) Rezeptor aktiviert. Die Rezeptoraktivierung führt zu einer Stimulierung der Osteoklastogenese, weshalb RANKL als einer der zentralen Regulatoren des Knochenumbaus gilt. Im Zuge dieser Arbeit wurde er nachgewiesen, um die Osteoklastenaktivität und damit die Knochenresorption beurteilen zu können (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012; Boyce and Xing, 2008)

Die Schnitte wurden mit 0,6 µg/ml RANKL-Primärantikörper (Polyklonaler Antikörper CD254/RANKL-Aff-Purified [Acris Antibodies GmbH, Nr. AP30826PU-N), Herford, Deutschland]) inkubiert. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte gemäß dem Protokoll des ABC-Systems.

OPG (Osteoprotegerin)

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, dient OPG als Marker für Knochenbildung. Als „löslicher Rezeptor“ für RANKL inhibiert OPG die RANK/RANKL- Interaktion und führt somit zu einer verminderten Osteoklastenaktivierung und Resorptionsrate (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

Für den immunhistochemischen Nachweis wurden die Schnitte nach dem Protokoll des ABC-Systems mit dem primären Antikörper OPG (Rabbit Anti-Osteoprotegerin Polyklonaler Antikörper [Abbiotec, Nr. 250800, San Diego, Californien) in einer 1:300 Verdünnung mit Dako Antikörper Verdünnung (Agilent Technologies, Nr. S3022, Santa Clara, USA) inkubiert.

BMP-2 (bone morphogenetic protein)

BMPs wurden 1965 erstmals von Dr. Marshall Urist entdeckt, der sie als Proteine beschrieb, die die Fähigkeit besitzen Knorpel- und Knochenbildung zu induzieren (Urist, 1996). BMPs sind multifaktorielle Zytokine, die zu der Superfamilie der „Transforming Growth Factors β “ (TGF β) gehören und zentral an der Osteogenese sowie an der Knochenregeneration beteiligt sind. Mittlerweile wurden mehr als 13 unterschiedliche BMP's identifiziert (Cheng et al., 2003).

BMP-2 ist ein sehr potentes Mitglied der BMPs. In vivo und in vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass BMP-2 sowohl eine entscheidende Rolle bei der Knochenbildung während der endochondralen Ossifikation, als auch bei der Osteoblastendifferenzierung spielt (Cheng et al., 2003). BMP-2 induziert mesenchymale Stammzellen und Präosteoblasten zur Osteoblastendifferenzierung und beschleunigt demzufolge die Knochenbildung und Knochenreparaturprozesse (Teixeira and Urist, 1998).

Im Zuge dieser Arbeit wurde BMP-2 im Sinne eines Markers für die Knochenformation und Osteoblastenbildung angefärbt. Das Protokoll der Immunhistochemie (ABC-System) befolgend, wurden die Schnitte mit dem BMP-2-Primärantikörper (Acris Antibodies GmbH, Nr. AP20597PU-N, Herford Deutschland) inkubiert. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:200 mit Dako Antikörper Verdünnung verwendet.

ED1

ED1, auch Anti-CD68 Antikörper genannt, ist ein monoklonaler Antikörper, der das Oberflächenantigen CD68 bindet. CD68, ein single-chain Glycoprotein von 90-100 kD, wird von Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen auf Membranen von

Phagolysosomen exprimiert. ED1 ist ein bewährter Marker zur Darstellung der Makrophagenaktivität und korreliert mit deren Phagozytenaktivität. Bei dieser Arbeit wurde ED1 bestimmt, da die Makrophagenaktivität im Bereich der Defektzone der verschiedenen Präparate die Knochenresorption und Knochenregeneration beeinflusst (Dijkstra et al., 1985).

Nach dem Protokoll der Immunhistochemie ENVISION-System wurden die Schnitte mit dem ED-1 Primärantikörper (Mouse Anti-Rat Monocyten/Makrophagen monoklonaler Antikörper: EMD Milipore Corporation, Nr. 2276307, Temcula, USA) in einer 1:3000 Verdünnung mit Dako Antikörper Verdünnung inkubiert.

Alpha smooth muscle actin (ASMA)

In der Immunhistochemie nutzt man ASMA zum Nachweis glatter Muskelzellen und infolgedessen zur Markierung von Gefäßen. ASMA bindet sowohl an glatte Muskelzellen in der Tunica media in venösen und arteriellen Gefäßen, als auch an Perizyten im Wandbereich von Kapillaren. Perizyten sind, wie auch glatte Muskelzellen, kontraktile Zellen, die in Kapillaren den Endothelzellen angelagert sind und dort eine wichtige Rolle bei der Endothelzellproliferation und der Angiogenese spielen. Im Zuge dieser Arbeit wurde ASMA genutzt um die Fibroblasten ähnlichen und ASMA-reaktiven Perizyten in Kapillaren zu markieren und so die Gefäßversorgung im Bereich des Knochendefekts darzustellen (Verbeek et al., 1994).

Zum Nachweis von ASMA wurden die Schnitte mit α -SMA-Primärantikörpern (Monoklonaler Maus Anti-Human Smooth Muscle Actin [Dako Agilent Antibodies GmbH, Nr. M0851, Herford, Deutschland]) inkubiert. Gemäß dem Protokoll der Immunhistochemie ENVISION-System, wurde der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 mit Dako-Antikörper-Verdünnung verdünnt.

Protokolle Immunhistochemie

	Lösung	Temperatur und Zeit
Entplasten	MEA ¹ Ethanol 100%, 96%, 80%, 70%	3 x 5 min bei RT ² je 5 min bei RT
Spülen	Waschpuffer	3 x 5 min bei RT
Inkubation	Primärer Antikörper in ausgetestetem Verhältnis mit Verdünnungspuffer (DAKO)	Über Nacht bei 4°C
Spülen	Waschpuffer	3 x 5 min bei RT
Inkubation	Biotinylierter sekundärer Antikörper ³ verdünnt mit 1% BSA in TBS und 1:8 Serum der betreffenden Spezies	30 min bei RT
Spülen	Waschpuffer	2 x 5 min bei RT
Inkubation	Vectastain ELITE ABC (Fa. Vector, PK 6100)	30 min bei RT in einer feuchten Kammer
Spülen	Waschpuffer Destilliertes Aqua	2 x 5 min bei RT 1 x 5 min bei RT
Färbung	Nova Red ⁴	5 min bei RT
Spülen	Bidestilliertes Aqua Destilliertes Aqua	5 min bei RT 2 x 5 min bei RT
Gegenfärbung	Hämotoxylin ⁵ verdünnt 1:3 mit Aqua Bidest.	5 sec bei RT

Bläuen	Unter laufendem Wasser	10 min
Entwässern	Ethanol 70%, 96%, 100%	Je 5 min bei RT
	Xylol	2 x je 5 min
Eindeckeln	Depex (VWR 361254 D)	

¹ (2-Methoxyethyl)-acetat

² Raumtemperatur

³ biotinylierter Sekundär- Antikörper 1:500 (DAKO)

⁴ Substrat kit für Peroxidase, Fa. Vektor

⁵ Shandon-Instant- Hämotoxylin, Fa. Thermo Scientific

Tabelle 5: Protokoll Immunhistochemie bei verwendetem ABC-System

	Lösung	Temperatur und Zeit
Entplasten	MEA	3 x 5 min bei RT
Dehydratation	100% Aceton	2 x 5 min
Rehydratation	100% Aceton + Waschpuffer (1:1)	2 x 5 min
Spülen	Waschpuffer	3 x 5 min bei RT
Blocken der endogenen Peroxidase	6% H ₂ O ₂	5 min bei RT
Spülen	Waschpuffer	3 x 5 min bei RT
Inkubation	Primärer Antikörper in ausgetestetem Verhältnis mit Verdünnungspuffer (DAKO)	60 min bei RT in einer feuchter Kammer
Spülen	Waschpuffer	3 x 5 min bei RT
Blockieren	Rattenserum (12,5%)	15 min bei RT

	Rattenserum) ¹ in 1% BSA/TBS	
Inkubation	Sekundärer Polymer- konjugierter Antikörper	30 min bei RT in einer feuchten Kammer
Spülen	Waschpuffer	2 x 5 min bei RT
Färbung	DAB + Substrat	5 bis 15 min bei RT
Spülen	Bidestilliertes Aqua Destilliertes Aqua	10 sec bei RT 4 x 5 min bei RT
Gegenfärbung	Hämotoxylin verdünnt 1:3 mit Aqua Bidest.	30 sec bei RT
Bläuen	Unter laufendem Wasser	10 min
Entwässern	Ethanol 70%, 96%, 100% Xylol	Je 5 min bei RT 2 x je 5 min
Eindeckeln	Depex	

¹ [Sigma-Aldrich GmbH, Nr. R9759, Taufkirchen, Deutschland]

Tabelle 6: Protokoll Immunhistochemie bei verwendetem ENVISION System

Stammlösung (Tris-NaCl- Puffer, TBS)	Für 20 x: 242,28 g (1 mol/l) Tris Base + 350,64 g (3 mol/l) NaCl in 2000 ml Aqua dest. Tris Base und NaCl in 1600 ml Aqua dest lösen, dann pH mit 25 % Salzsäure auf 7.4 einstellen und auf 2000 ml auffüllen.
TBS-Puffer 1x	0,15mol/l NaCl, 0,05mol/l Tris/HCl

	Stammlösung 1:20 mit Aqua dest verdünnen
Tris-Waschpuffer (WP)	Stammlösung 1x, 0,025% Triton-X 100 zu 100 ml TBS 20x 0,5g Triton-X 100 hinzufügen und mit Aqua dest auf 2000 ml auffüllen

<p>Tabelle 7: Vorbereitung der einzelnen Komponenten für die immunhistochemischen Färbungen</p>
--

3.8 Histomorphometrie

Die photomikroskopischen Ergebnisse der verschiedenen Färbungen wurden durch eine histomorphometrische Auswertung ergänzt. Die histomorphometrischen Auswertungen erfolgten, indem Auszählungen der positiv angefärbten Zellen, bzw. Berechnungen der positiv angefärbten Flächen (mm^2) der unterschiedlichen Färbungen im Bereich der ROI durchgeführt wurden.

Region of interest

Für die Präsentation sowie die Auswertung der histologischen als auch der histomorphometrischen Ergebnisse wurde der ehemalige Defektbereich mit einem schwarzen Kreis (Durchmesser 2,5mm) als „Region Of Interest“ (ROI) markiert (Abb. 10). Er entspricht somit der Größe des Knochendefekts (2,5 mm). Der Bereich der ROI ist von besonderem Interesse, da dort die Implantatretention, die Knochenbildung sowie die lokale Wirkung des Biomaterials und des beigefügten Bortezomibs beobachtet werden kann.

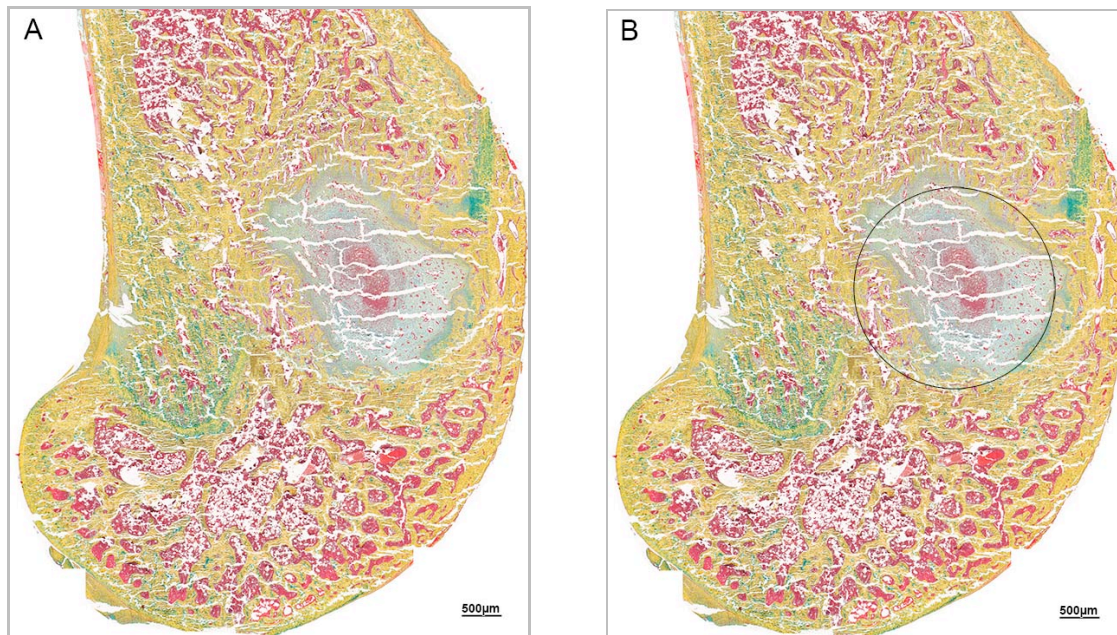


Abbildung 10:

Bild A zeigt eine MOVAT- Pentachrome Färbung der Xerogel- Granulat + 500µg Bortezomib Implantgruppe. Zur besseren Orientierung ist in Bild B der ehemalige Defektbereich mit einem schwarzen Kreis umrundet. Dieser Bereich entspricht der ROI und ist von besonderer Bedeutung für die Analyse der Knochenbildung und der Biokompatibilität des Biomaterials.

3.9 Statistik

Es erfolgte eine statistische Analyse der histomorphometrisch erhobenen Daten mithilfe der Statistikprogramme IBM SPSS Statistics V21.0 (IBM Inc., California) und GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA). Hierbei wurden die Ergebnisverteilung als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Die Daten wurden zunächst mithilfe des Oneway Anova Tests deskriptiv ausgewertet. Dieser Test dient als Varianzanalyse bei unabhängigen Stichproben als erweiterter t-Test der Überprüfung der Nullhypothese, die besagt, dass es keinen Unterschied bezüglich der Gruppenmittelwerte einer Variablen (entspricht hier beispielsweise der Knochenneubildung) zwischen allen Gruppen in einer Grundgesamtheit gibt (Fassl, 2012). Der Anova Test wurde hier angewandt, da so mehrere Gruppen miteinander verglichen werden können. Beim t-Test hingegen können nur zwei Gruppen

miteinander verglichen werden (Fassl, 2012). Es zeigten sich signifikante Unterschiede der Mittelwerte der einzelnen Messungen und somit konnte die Nullhypothese widerlegt werden.

In einem zweiten Schritt wurden die Daten mithilfe des Post-Hoc-Tests auf die Frage hin analysiert, welche Mittelwerte der verschiedenen Gruppen sich unterscheiden. Bei dieser nicht parametrischen Analyse wird berücksichtigt, dass die Normalverteilung im Sinne einer klassischen Gaußschen Verteilungskurve bei den hier verwendeten Daten nicht gegeben ist, da die Schiefe und Wölbung große Unterschiede aufweisen (Jannssen and Laatz, 2013).

Der Post-Hoc-Test ermöglicht mithilfe von Mehrfachvergleichen, die Untersuchung zwischen den einzelnen Gruppen. Es kann so analysiert werden, ob sich beispielsweise die Mittelwerte von Gruppe 2 im Vergleich zu Gruppe 3 unterscheiden oder Gruppe 2 zu Gruppe 4. Im Zuge dieses Tests wurden die ermittelten Daten mithilfe der Bonferroni Korrektur bezüglich ihres Alpha-Fehlers neutralisiert.

Für die Beurteilung der statistischen Analysen wurden Standardfehler mit p-Werten $< 0,05$ als signifikant festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Makroskopische Befunde

Postoperativ konnten bei keinem der Tiere Zeichen einer Wundinfektion in Form einer Schwellung, Rötung oder Überwärmung im Bereich des Knochendefekts festgestellt werden. Die Tiere belasteten die betroffene Extremität unmittelbar postoperativ voll.

Postmortal war die Implantationsstelle des Xerogels nach Entfernung des Weichteilgewebes makroskopisch noch erkennbar. Das Implantat an sich war jedoch nur noch bei einigen Tieren teilweise erkennbar. Das Implantat erschien makroskopisch bereits fast vollständig abgebaut worden zu sein. Der ehemalige Defektbereich war fest mit dem restlichen Knochen verbunden. Eine Implantatlockerung oder Zeichen einer abgelaufenen Implantat Infektion konnten bei keinem der Tiere festgestellt werden.

4.2 Histologische Befunde

Knochenbildung

Bei Gruppe 4 und 5 ließ sich bei der mikroskopischen Untersuchung eine korrekte Materialplatzierung erkennen (Abb. 12, 13). Die Knochendefekte (kreisrundes Bohrloch) wurden jeweils im distalen Femur im Bereich des lateralen Femurkondylus gesetzt. Die Übersichtsaufnahmen ermöglichen eine Darstellung des ehemaligen Defektbereichs und des umgebenden Gewebes. Sie zeigen Reste der Wachstumsfuge und den charakteristischen Knochenaufbau mit der äußeren Kortikalis aus mineralisiertem Knochen und dem in den Spongiosazwischenräumen lokalisierten Knochenmark. Der ehemalige Defektbereich, als Ort der Knochenneubildung, wurde zusätzlich in einer höheren Vergrößerung präsentiert.

Beim Leerdefekt (Abb. 11A, C) zeigte sich im Bereich der Defektzone ein vorwiegend spongiöser Umbau. Bei den Xerogel-Granulat Implantaten (Abb. 11B, D) und den Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantaten (Abb. 12 A, C) waren die Implantatränder von neugebildetem mineralisiertem Knochengewebe umgeben. Bei den

Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantaten (Abb. 12B; D) und noch deutlicher bei den Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantaten (Abb. 13A, B) waren im Bereich der Defektzone eine inflammatorische Reaktion und nur noch vereinzelte Implantatreste zu erkennen.

In höheren Vergrößerungen der mit Movat angefärbten Präparate zeigten sich in den einzelnen Gruppen unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Knochenbildung.

Bei der Kontrollgruppe konnte man im Defektbereich vorwiegend eine desmale Ossifikation und Knochenmark enthaltende Spongiosa erkennen (Abb. 11 C).

Bei den Xerogel-Granulat Implantaten ohne Bortezomib präsentierte sich eine stärkere Knochenbildung als im Leerdefekt. Deutlich erkennbar ist hier, dass das Implantat zum Teil durch mineralisiertes Knochengewebe ersetzt wurde (Abb. 11 D).

Bei den Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantaten ist der größte Teil des ehemaligen Implantats bereits durch neues Knochengewebe ersetzt (Abb. 12 C). In dieser Gruppe dominiert in der Region of interest unmineralisiertes Osteoid und mineralisiertes Knochengewebe. Im Vergleich zu den anderen Gruppen ist hier am meisten Knochengewebe gebildet worden.

Bei den Xerogel-Granulat Implantaten, die mit 500µg Bortezomib versetzt wurden, ist die Knochenbildung im Defektbereich weniger prominent. In dieser Gruppe zeigte sich in der Region of interest neben zum Teil mineralisiertem Gewebe auch bereits eine beginnende inflammatorische Reaktion (Abb. 12 D).

Noch viel stärker ausgeprägt war dies bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib zu beobachten. Hier war im ehemaligen Defektbereich fast kein mineralisiertes Gewebe erkennbar. Es herrschte ein nicht angefärbtes graues Gewebe vor, das am ehesten inflammatorisch bedingt ist und auch über den Defektbereich herausragte (Abb. 13 B).

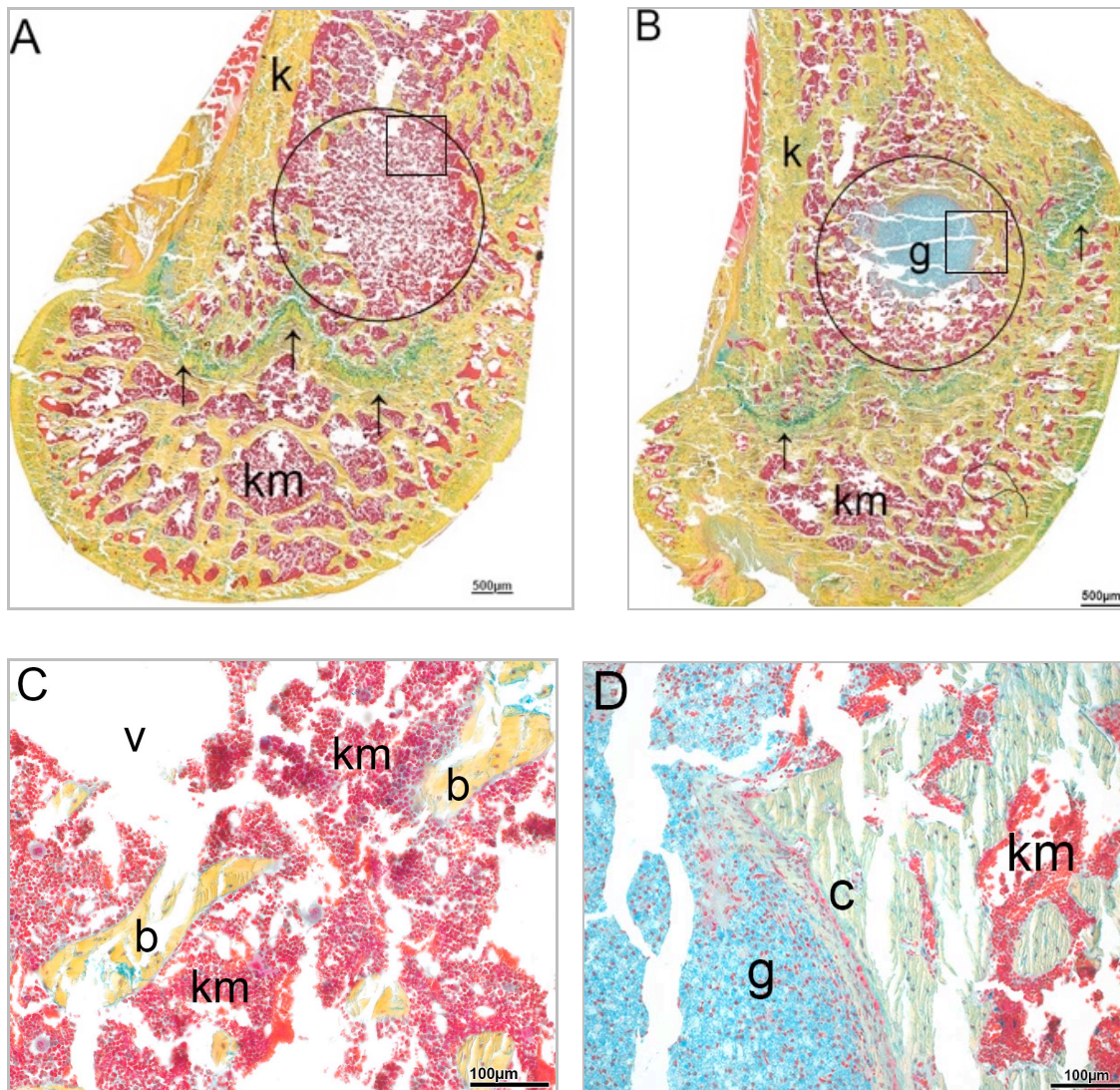


Abbildung 11: MOVAT-Pentachrome Photomikroskop Aufnahmen mit je einer Übersicht des Defektbereichs, sowie einer Vergrößerung des mit einem Rechteck markierten Areals. Leerdefekt (A; C) und Xerogel-Granulat Implantat (B; D). Vorwiegend spongiöser Umbau des ehemaligen Defektbereichs beim Leerdefekt (C). Bei dem Xerogel-Granulat Implantat (B) liegt im ehemaligen Defektbereich teilweise mineralisiertes Gewebe vor, zudem ist hier Granulationsgewebe (g) zur erkennen (D).

schwarzer Kreis = ROI, K = Kortikalis, km = Spongiöser Knochen mit Knochenmark, g = Granulationsgewebe, b= bone, c = Knochengewebe, v = artifizielle Spalten (void), schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge

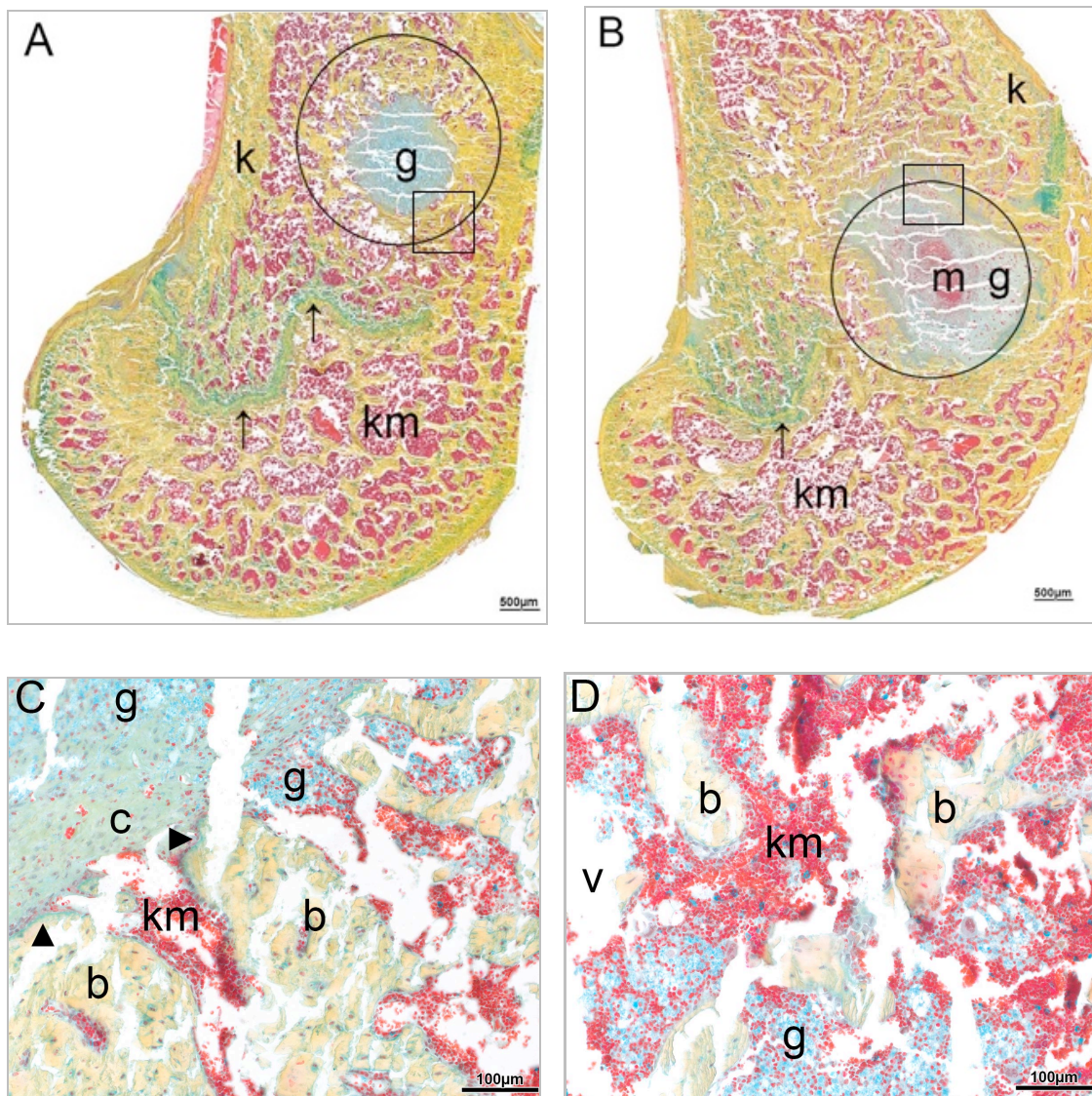


Abbildung 12: MOVAT- Pentachrome Übersichtsbilder des Defektbereichs und Vergrößerung des mit einem Rechteck markierten Bereichs. Xerogel-Granulat + 100 µg Bortezomib (A, C), Xerogel-Granulat + 500 µg Bortezomib (B, D)

Xerogel-Granulat + 100 µg Bortezomib: Vorherrschende Knochen und Osteoidbildung besonders am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe (C, rote Pfeile = Osteoidbildung)

Xerogel-Granulat + 500 µg Bortezomib: teilweise mineralisiertes Gewebe (b), Materialreste (m) und Knochenmark (km). g markiert entzündlich verändertes Gewebe, was sich vereinzelt von der region of interest ins umliegende Gewebe ausbreitet.

Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, k = Kortikalis, km = Spongioser Knochen mit Knochenmark, v = artifizielle Spalten(void), g = Granulationsgewebe, m = Material, b= bone, c = Knorpelgewebe, Pfeilkopf = Osteoidbildung, schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge

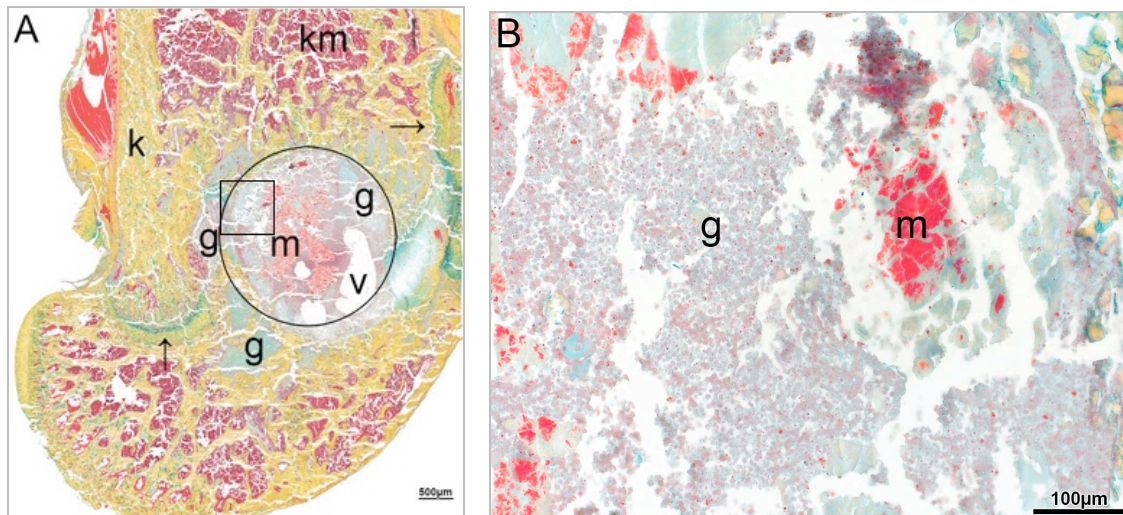


Abbildung 13: Movat- Pentachrome Färbung: Übersichtsbild des Defektbereichs und Vergrößerung des markierten Rechtecks. Xerogel-Granulat + 2500 µg Bortezomib (A, B)
 Ungefärbtes gräuliches Gewebe, a.e. Granulationsgewebe entzündlichen Ursprungs (g), breitet sich vom ehemaligen Defektbereich in den umliegenden Lagerknochen aus.
 Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, K = Kortikalis, km = Spongiöser Knochen mit Knochenmark, v = artifizielle Spalten (void), m = Material, g = Granulationsgewebe, b= bone, schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge

Inflamationszone

Auf den Movat-Pentachrom Übersichtsaufnahmen präsentierten sich im Bereich des ehemaligen Defektbereichs zum Teil Zeichen einer lokalen inflammatorischen Reaktion des Gewebes. Je nach Implantat stellte sich die Inflamationszone als unterschiedlich stark ausgeprägter gräulicher nur schwach angefärbter Bereich dar (g= Granulationsgewebe).

In den Schnitten der Gruppen 1 bis 3 (Abb. 11, 12) überwog im Defektbereich mineralisiertes Gewebe und Bindegewebe. Granulationsgewebe, mit Schaumzellen und vereinzelten Materialresten, war in diesem Bereich ebenfalls vorzufinden, aber deutlich weniger als bei den Gruppen 4 und 5 (Abb. 12, 13).

In den Xerogel-Granulat Implantaten + 2500µg Bortezomib (Abb. 13 A, B) dominierte das entzündlich veränderte Gewebe, während mineralisiertes Gewebe fast nicht vorhanden war. In dieser Gruppe füllte die Inflamationszone fast den gesamten Defektbereich aus und breitete sich in den umliegenden Lagerknochen aus. Hier

präsentierten sich Zellen, die eine Vielzahl an Vakuolen besitzen und dadurch ein schaumiges Aussehen erlangen (siehe Abb. 13, B). Vereinzelt ließen sich in diesem Granulationsgewebe auch Materialreste darstellen.

Zur detaillierteren Darstellung der beschriebenen Inflammationszone eignen sich die mit Toluidin-Blau gefärbten Schnitte (siehe Abb. 14, A und B). Das entzündlich veränderte Gewebe erschien hier als gefäßreiches Granulationsgewebe, das den ehemaligen Defektbereich ausfüllt. Neben reichlich Kollagenfasern und Zelldebris sind schaumartige und vesikelbeladene Zellen zu erkennen (Abb. 14, A). Diese Zellen, auch als Schaumzellen bezeichnet, sind am ehesten als entartete Makrophagen zu bewerten. Höhere Vergrößerungen ermöglichten zudem die Darstellung der zahlreich vorkommenden segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (Abb. 14, B).

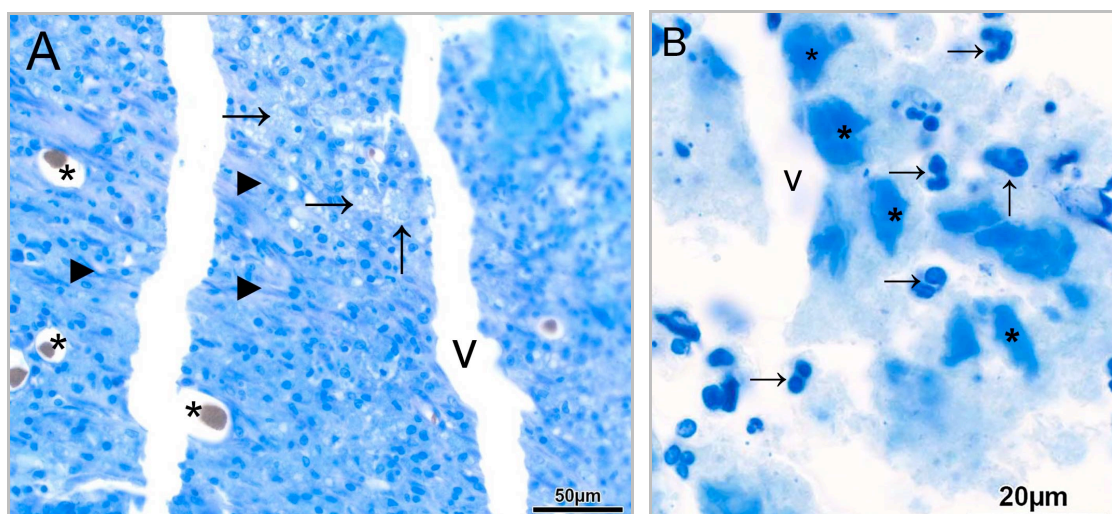


Abbildung 14:

Darstellung der Inflammationszone mit verschiedenen Vergrößerungen Toluidin-Blau angefarbter Schnitte der Xerogel-Granulat + 2500 µg Bortezomib Gruppe.

A: Kollagenfasern, Kollagenfibrillen (hellblau gefärbte faserartige Strukturen, mit einem schwarzen dreiecksförmigen Pfeil markiert) und hellblau gefärbte Zelltrümmer umgeben Blutgefäße mit Mikrofil gefüllt (*) und mit Vakuolen beladene schaumartige Zellen (schwarzer Pfeil).

B: Segmentkernige neutrophile Granulozyten (schwarzer Pfeil) und Zelltrümmer, Debris (*) als Zeichen einer entzündlichen Gewebereaktion.

4.3 Enzymhistochemische Ergebnisse

Osteoblastenfunktion

Um die Osteoblastenfunktion und somit das Ausmaß der Knochenbildung beziehungsweise der Mineralisation innerhalb der einzelnen Gruppen darzustellen, wurden die Schnitte auf ALP-positive Zellen hin untersucht (siehe Abbildung 15 - 17). Die Alkalische Phosphatase ist in der Plasmamembran der Osteoblasten lokalisiert. Osteoblasten ließen sich besonders häufig an der Grenze zwischen ehemaligen Defektbereich und umgebenden Knochengewebe finden. In diesem Bereich zwischen Granulationsgewebe mit vereinzelt Materialresten und angrenzendem Knochengewebe ist eine sehr hohe Mineralisationsrate zu beobachten.

Die höchste Anzahl ALP-positiver Zellen konnte bei den Xerogel-Granulat Implantaten + 100µg Bortezomib nachgewiesen werden (s. Abb. 16A und C). Die Knochenneubildung reichte in dieser Gruppe meistens bereits bis in das Zentrum der Defektregion.

Auch bei Schnitten der Xerogel-Granulat Implantate ohne Bortezomib (Abb. 15 B, D) oder mit 500µg Bortezomib (Abb. 16 B, D) wurden mehr ALP-positive Zellen angefärbt als in der Gruppe der Leerdefekte (Abb. 15 A, C).

Die Xerogel-Granulat Implantate + 2500µg (Abb. 17) Bortezomib zeigten nur sehr wenige ALP-positive Zellen im ehemaligen Defektbereich. Am Rande der Inflamationszone, die meist über den ROI herausragte, waren jedoch ALP-positive Zellen nachzuweisen.

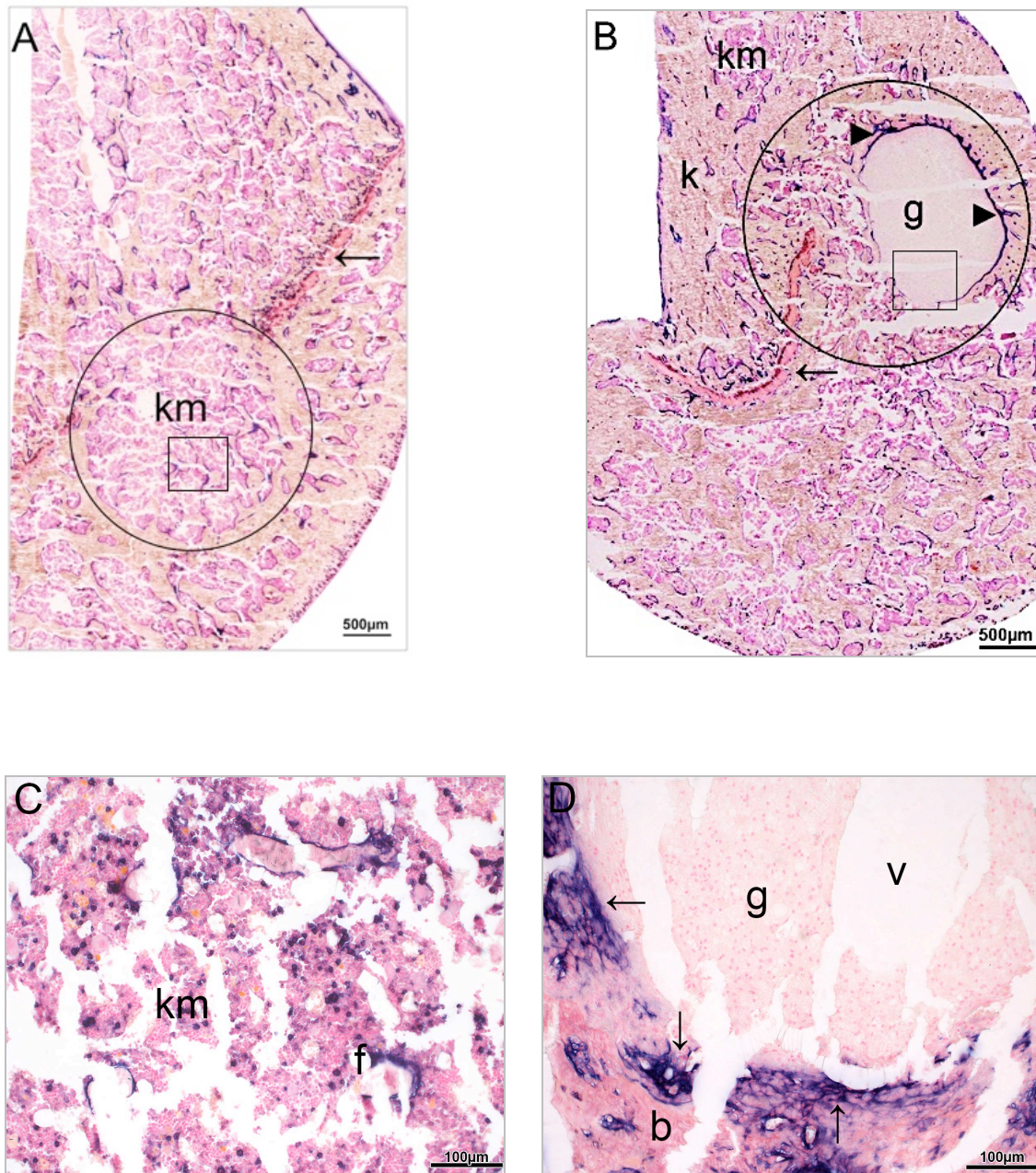


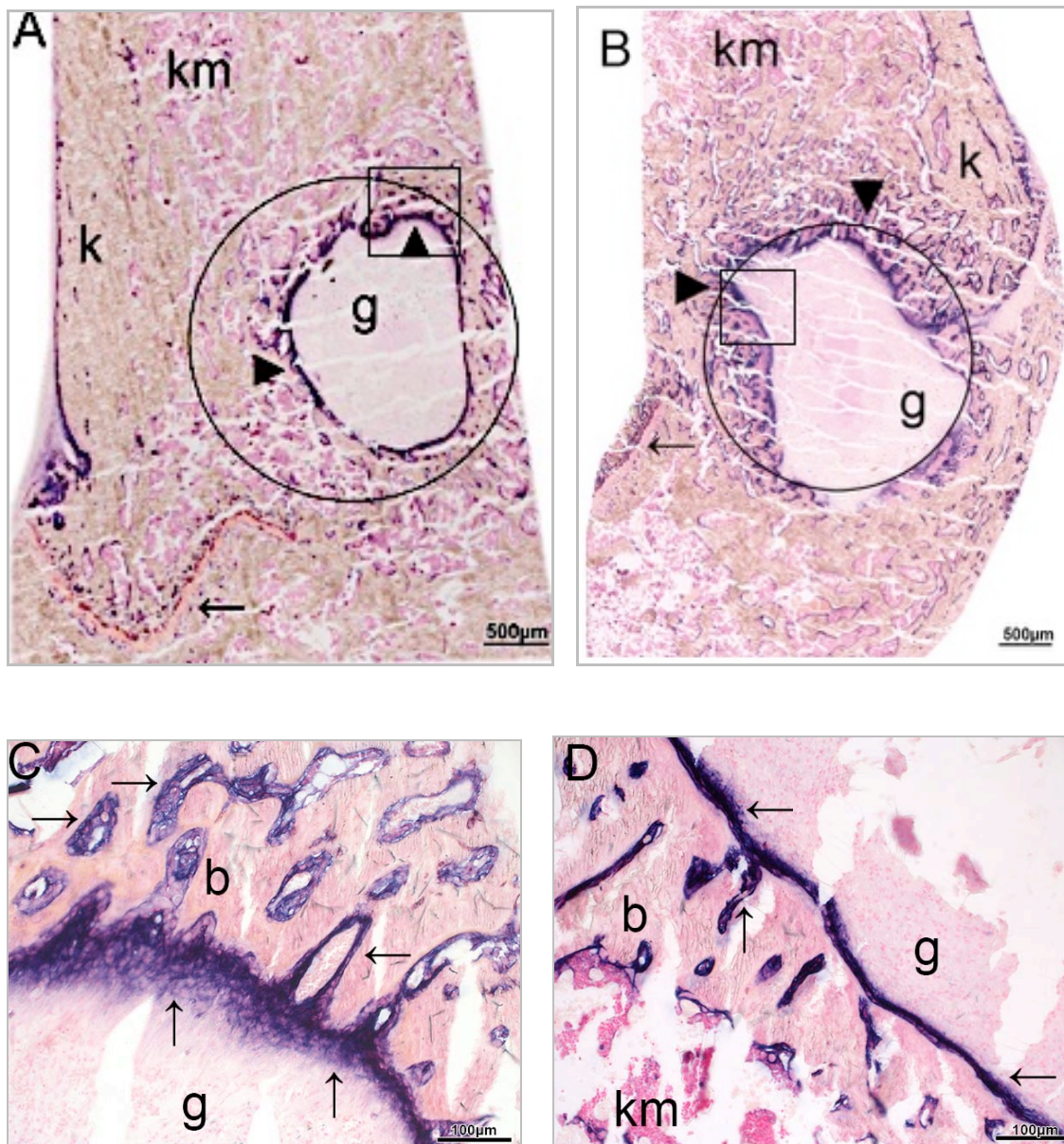
Abbildung 15:

Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen, des mit einem Rechteck markierten Bereichs, von Schnitten Leerdefekts (A, C) und der Xerogel-Granulat Implantate (B, D) mit dunkel-violett angefärbten ALP-positiven Zellen.

Im Leerdefekt (A, C) überwiegt in der *region of interest* kollagenes Bindegewebe mit Fettzellen ohne ALP-positive Zellen.

In Gruppe 2 (B; E) sind am Übergang zwischen ehemaligen Defekt und Knochengewebe ALP-positive Zellen zu finden (schwarze Pfeile).

Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, km = Spongiöser Knochen mit Knochenmark, v = artifizielle Spalten (void), b= bone, f = Fettzellen, Pfeilkopf = ALP-positive Zellen, dicker schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge


Abbildung 16:

Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen des mit einem Rechteck markierten Bereichs der Xerogel-Granulat Implantate + 100µg (A, C) oder 500µg (B, D) Bortezomib mit dunkel-violett angefärbten ALP-positiven Zellen.

Hoher Anteil ALP-positiver Zellen bei Xerogel-Granulat Implantate + 100µg Bortezomib (A, C) hauptsächlich im Bereich zwischen Granulationsgewebe und neuem Knochengewebe. Bei Xerogel-Granulat + 500 µg Bortezomib (B, D) ebenfalls viele ALP-positive Zellen, jedoch weniger als bei A und C.

Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, k = Kortikalis, km = Spongioser Knochen mit Knochenmark, v = artifizielle Spalten (void), b= bone, Pfeilkopf = ALP-positiv Zellen, schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge

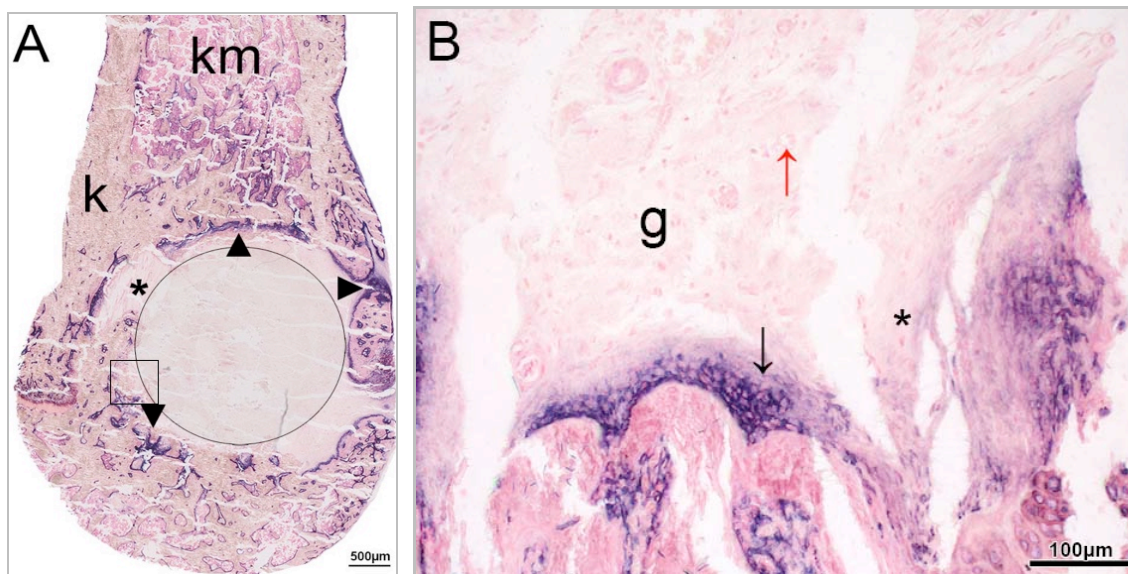


Abbildung 17:

Anfärbung ALP-positiver Zellen bei Xerogel-Granulat Implantaten + 2500µg Bortezomib in einer Übersichtsaufnahme (A) und einer Vergrößerung des mit einem Rechteck markierten Bereichs (B). Kaum ALP-positive Zellen angefärbt. Im Defektbereich überwiegen inflammatorische Zellen und nur vereinzelt sind ALP-positive Zellen zu erkennen.

Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, k = Kortikalis, km = Spongioser Knochen mit Knochenmark, Pfeilkopf = ALP-positive Zellen, schwarzer Pfeil = ALP-positive Zellen, Stern = inflammatorisches Gewebe, das sich in den umgebenden Lagerknochen ausbreitet, roter Pfeil = Schaumzellen

Osteoklastenfunktion

Die Osteoklastenfunktion wurde mithilfe des Nachweises der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) als histochemischer Marker der Osteoklasten nachgewiesen. Dies ermöglichte eine Analyse der Knochenresorption, die - wie auch die Knochenbildung - die Mineralisation eines Knochens beeinflusst.

Bei allen Gruppen konnten im ehemaligen Defektbereich nur vereinzelt TRAP-positive Zellen nachgewiesen werden. Am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe zeigten sich die meisten TRAP-positive Zellen.

Bei dem Vergleich der einzelnen Gruppen fiel auf, dass bei den Schnitten der Leerdefekte (Abb. 18 A, C), der Xerogel-Granulat Implantate (Abb. 18 B, D) und der Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantate (Abb. 19 B, D) jeweils ähnlich viele TRAP positiven Zellen angefärbt worden waren.

Die Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantate (Abb. 19 A, C) wiesen die höchste TRAP-Anfärbung und somit die höchste Osteoklastenaktivität auf. Es zeigte sich jedoch auch hier nur geringe Unterschiede zwischen den Xerogel-Granulat +

100µg Bortezomib Implantate und Präparaten der Gruppe 1, 2 und 4. Signifikante Unterschiede waren dagegen bei dem Vergleich aller Gruppen (1, 2, 3, 4) mit den Schnitten der Xerogel-Granulat + 2500µg (Abb. 20 A, B) Bortezomib Implantate erkennbar. Bei Schnitten dieser Implantatgruppe waren im ehemaligen Defektbereich bedeutend weniger TRAP-positive Zellen erkennbar, da hier das Granulationsgewebe die Migration von Zellen wie beispielsweise den Osteoklasten verhinderte.

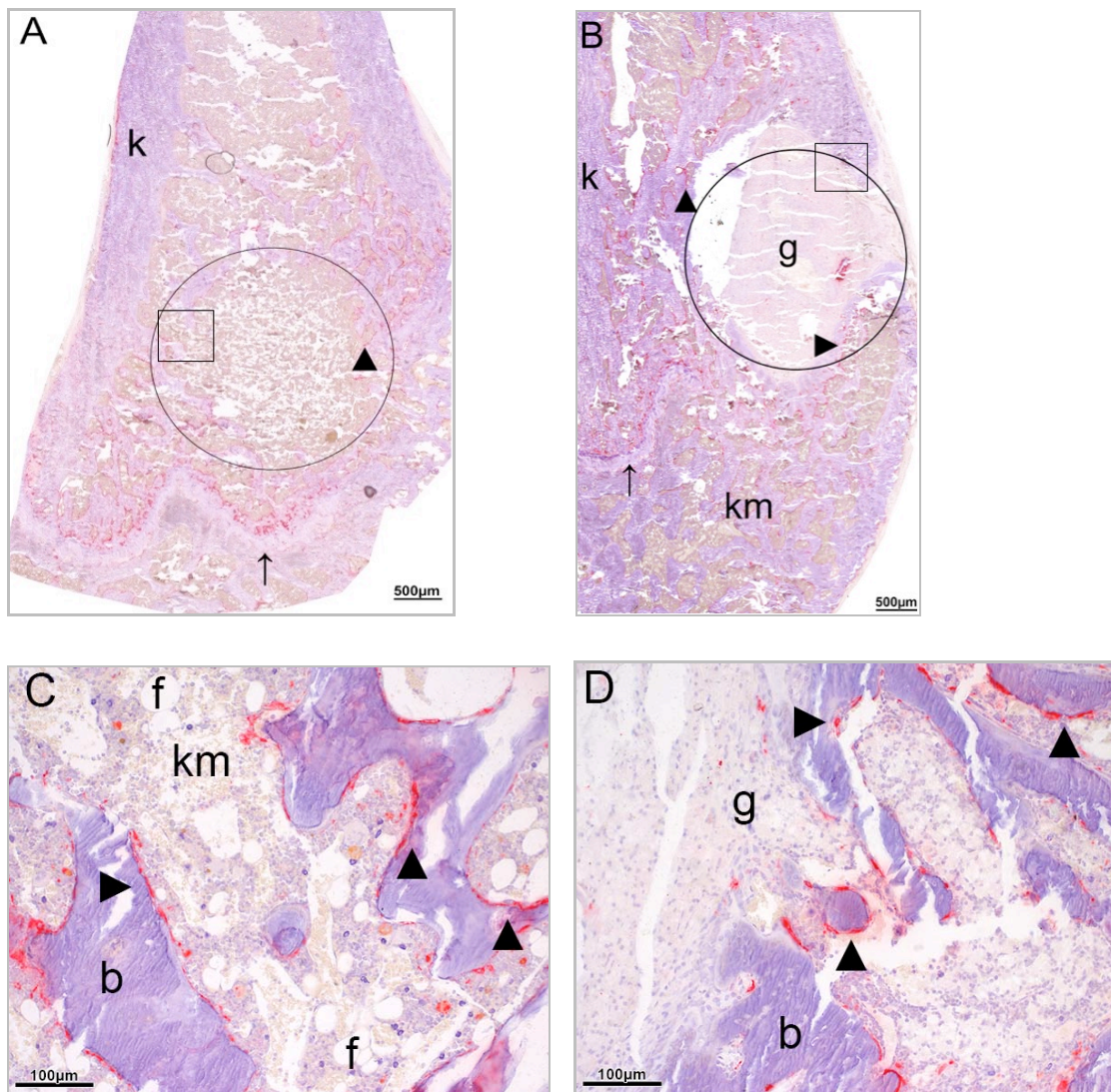
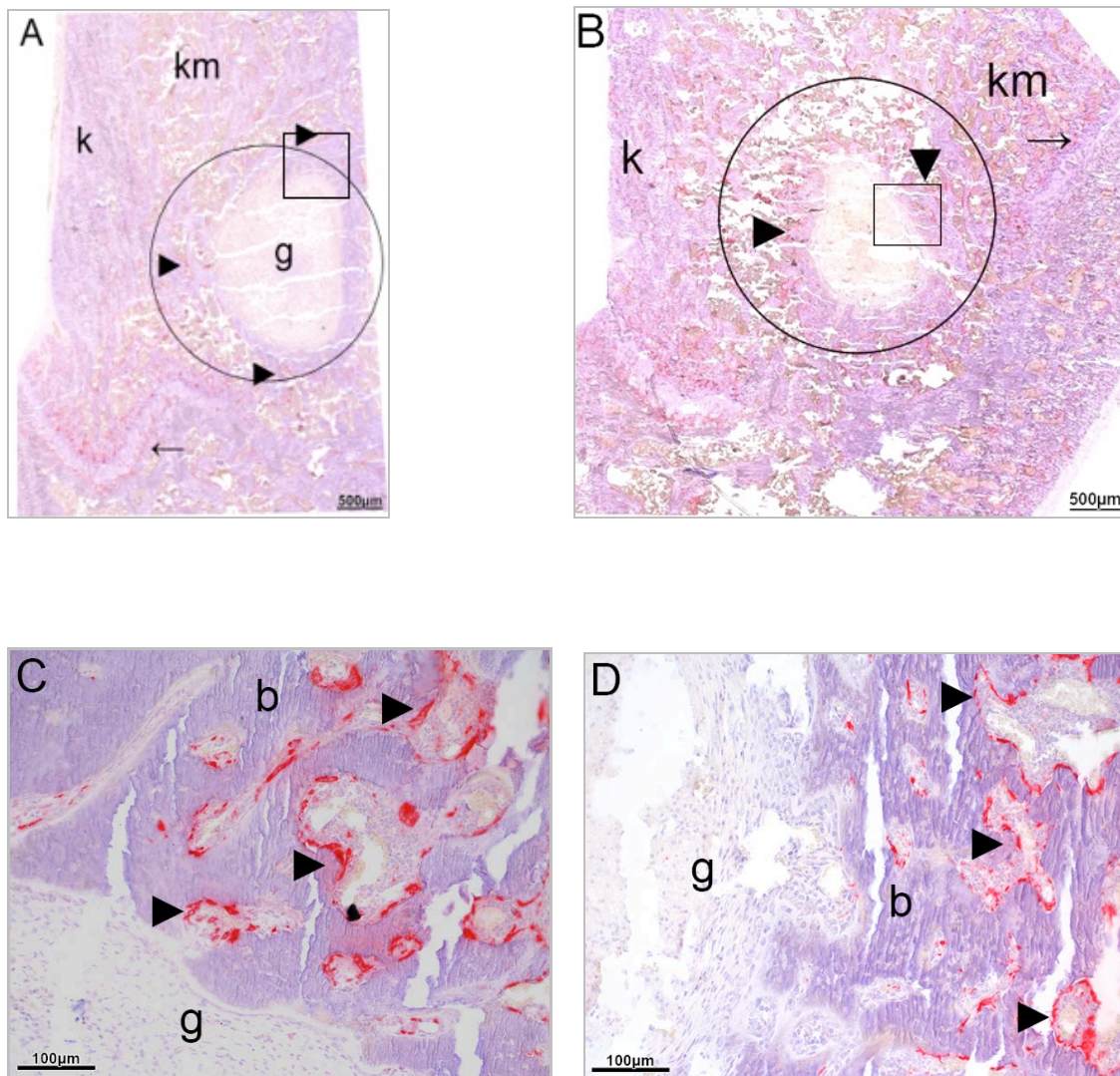


Abbildung 18:

Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen der ROI des Leerdefekts (A, C) und der Xerogel-Granulat Implantate (B, D) mit rot angefärbten TRAP-positiven Zellen. Beide Gruppen zeigen im ehemaligen Defektbereich vergleichbar viele TRAP- positive Zellen. In den höheren Vergrößerungen (C,D) stellen sich die vor allem am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe vorzufindenden TRAP- positiven Zellen als große, mehrkernige Zellen dar. Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, k = Kortikalis, km = Spongioser Knochen mit Knochenmark, schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge, g = Granulationsgewebe, b = bone, f = Fettzellen, Pfeilkopf = TRAP-positive Zellen am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe, schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge


Abbildung 19:

Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen der ROI der Xerogel-Granulat Implantate + 100µg (A, C) und 500µg (B, D) Bortezomib mit rot angefärbten TRAP-positiven Zellen.

Hoher Anteil TRAP-positiver Zellen bei Xerogel-Granulat Implantaten + 100µg Bortezomib (A, C) am gesamten Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe. Xerogel-Granulat + 500 µg Bortezomib (B, D) mit ebenfalls vielen TRAP-positive Zellen, jedoch etwas weniger als bei A und C.

Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, k = Kortikalis, km = Spongiöser Knochen mit Knochenmark, g = Granulationsgewebe, b = Knochengewebe, Pfeilkopf = TRAP-positive Zellen am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe, schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge

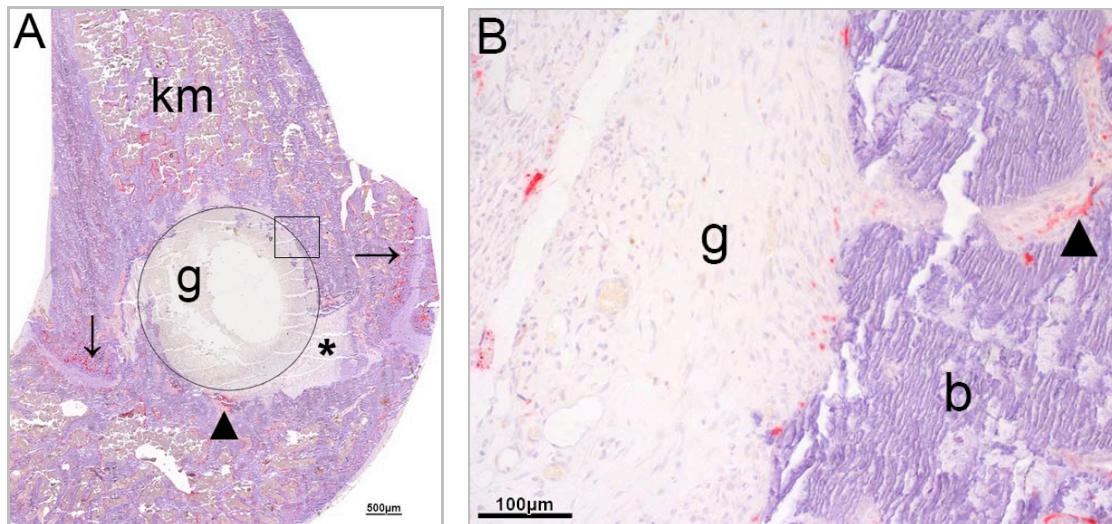


Abbildung 20:

Anfärbung TRAP-positiver Zellen bei Xerogel-Granulat Implantaten + 2500µg Bortezomib in einer Übersichtsaufnahme (A) und einer Vergrößerung der ROI (B). Nur vereinzelt TRAP- positive Zellen angefärbt. Im Defektbereich überwiegen inflammatorische Zellen. Beschriftung: schwarzer Kreis = ROI, k = Kortikalis, km = Spongiöser Knochen mit Knochenmark, g = Granulationsgewebe, b = Knochengewebe, Pfeilkopf = TRAP-positive Zellen, schwarzer Pfeil = Wachstumsfuge, Stern = inflammatorische Zellen, die sich in das umgebende Gewebe ausbreiten

4.4 Immunhistochemische Ergebnisse

OPG/RANKL-Expression

Die OPG/RANKL-Rate ist von zentraler Bedeutung für die Beurteilung der Osteoklastogenese und somit auch für die Beurteilung des Knochenumbaus. Beide Marker werden von reifen Osteoblasten exprimiert und beeinflussen die Osteoklastogenese in antagonistischer Weise. Während RANKL die Osteoklastogenese stimuliert, hemmt OPG sie.

Eine erhöhte OPG-Expression zeigte sich bei den Schnitten der Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantate im Vergleich zu den Leerdefekten, den Xerogel-Granulat Implantaten und den Xerogel-Granulat + 500 µg Bortezomib Implantaten (Abb. 21). Die OPG-Expression war im Bereich des Übergangs zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe am höchsten. Entsprechend war die RANKL-Expression, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der OPG-Färbungen, bei den Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantaten am niedrigsten (Abb. 22). Die höchste OPG/RANKL-Rate zeigte sich demzufolge bei den Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantaten, was für eine gesteigerte Osteoblastenfunktion mit erhöhtem Knochenaufbau in dieser Implantatgruppe spricht.

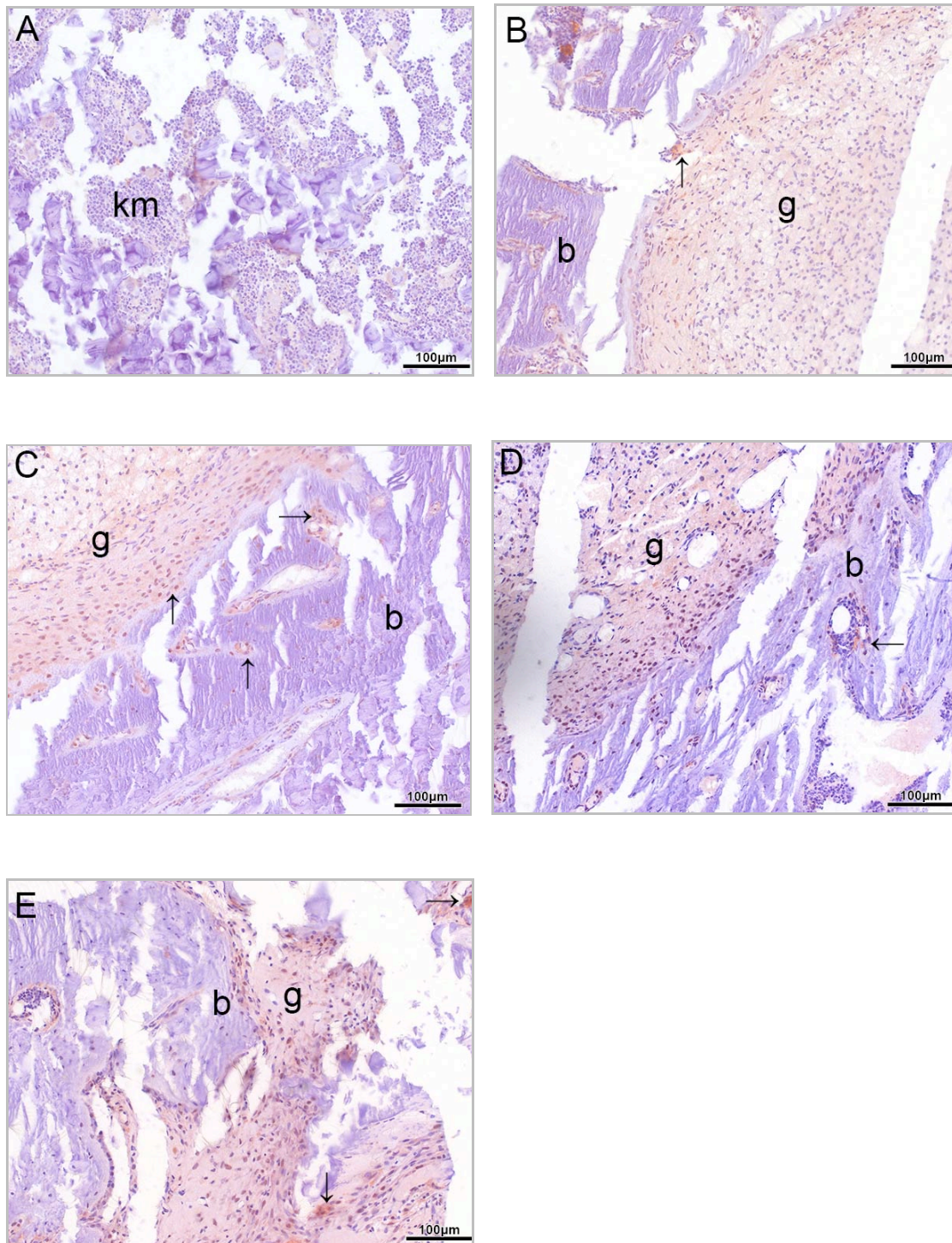


Abbildung 21: Immunhistochemische OPG-Färbung der unterschiedlichen Implantatgruppen: Bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantaten (C) zeigt sich eine erhöhte OPG-Expression im Vergleich zu Schnitten des Leerdefekts (A), der Xerogel-Granulat Implantate (B), der Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantate (D) und der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantate (E).
Beschriftung: km = Spongiosa, g = Granulationsgewebe, b = bone, schwarzer Pfeil = stark bräunliche Anfärbung OPG-positiver Zellen

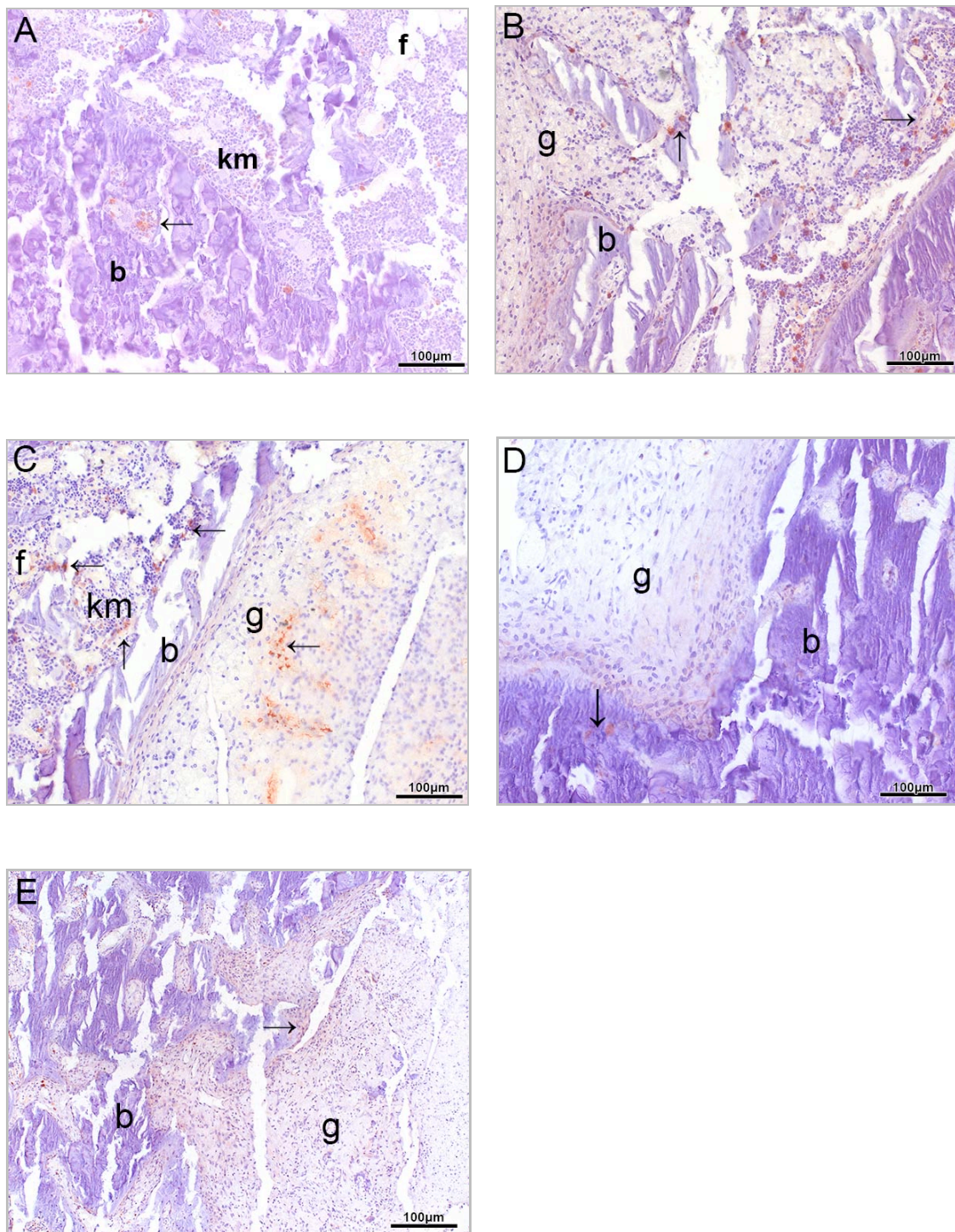
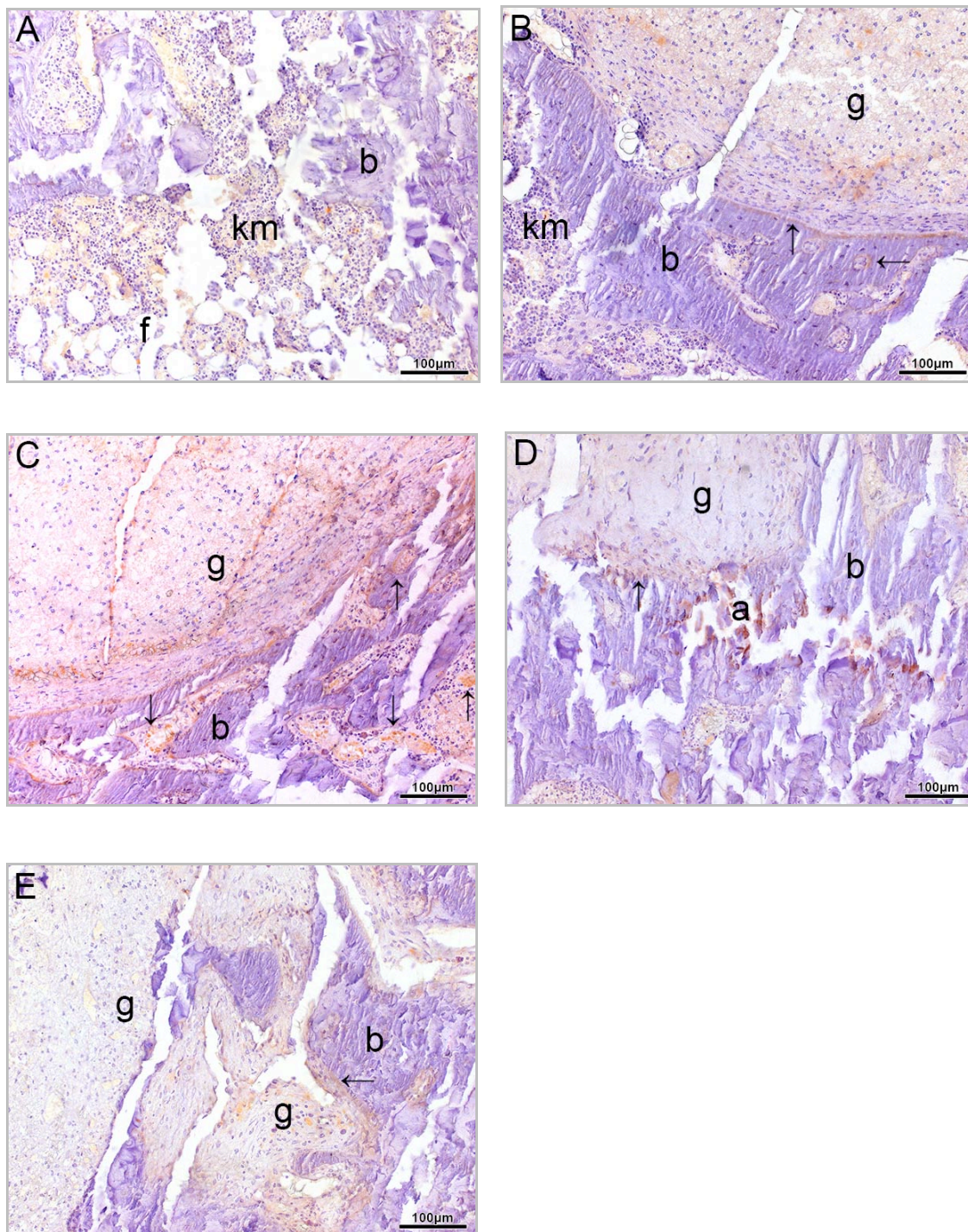


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung entplasteter Schnitte auf RANKL:

Nur vereinzelte Anfärbung RANKL-positiver Zellen im ehemaligen Defektbereich. Beim Leerdefekt (A) dominiert Spongiosa, bei den restlichen Implantatgruppen sind RANKL-positive Zellen insbesondere am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe erkennbar.

Xerogel-Granulat - Implantat (B), Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantaten (C), Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantate (D) und der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantate (E)

schwarzer Pfeil = bräunliche Anfärbung RANKL-positiver Zellen, km = Spongiosa, g = Granulationsgewebe, b = bone, f = Fettzellen

BMP-2**Abbildung 23:**

Die vergrößerten Darstellungen des ehemaligen Defektbereichs zeigen eine vermehrte BMP2-Expression bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib (C), Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib (D) sowie der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib (E) Implantate im Vergleich mit dem Leerdefekt (A) und den Xerogel-Ganulat Implantaten (B). Am deutlichsten ist die bräunliche BMP2-Anfärbung am Übergang zwischen Granulationsgewebe und neuem Knochengewebe zu erkennen.

schwarzer Pfeil = Regionen mit der stärksten Anfärbung bräunlicher BMP2-positiver Zellen, km = Spongiosa, g = Granulationsgewebe, b = bone, f = Fettzellen, a = Schneideartefakt

Bone morphogenetic protein 2 ist ein potenter Marker der Osteoblastogenese und somit der Knochenbildung. Bei der Färbung zeigte sich die höchste BMP2-Expression bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantate (Abb. 23 C). Schnitte der Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantate und der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantate (Abb. 23 D, E) wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den Xerogel-Granulat Implantaten (Abb. 23 A, B) ebenfalls eine erhöhte BMP2-Expression auf. Bei der Kontrollgruppe war eine auffallend geringere BMP2-Expression im ehemaligen Defektbereich erkennbar.

Makrophagenaktivität

Makrophagen ermöglichen durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose die Knochenresorption und sind am *bone remodelling* beteiligt. Um eine Aussage über die Makrophagenaktivität treffen zu können, wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper ED1 inkubiert. Nach einer Antigen-Antikörperbindung konnten so ED1-positive Zellen bräunlich angefärbt werden (Abb. 24).

Die höchste Makrophagenaktivität war im ehemaligen Defektbereich am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe zu erkennen. Bei den Schnitten der Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantate und der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantate (Abb. 24 D, E) waren eine höhere Makrophagenaktivität als bei den Schnitten der anderen Gruppen vorzufinden. Hier ließen sich ED1-positive Zellen in der gesamten Inflammationszone anfärben. Dieses Ergebnis weist auf eine wichtige Rolle der Makrophagen bei der beobachteten inflammatorischen Reaktion hin.

Bei der Kontrollgruppe und bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantate (Abb. 24 A, B) waren die geringste Makrophagenaktivität im ehemaligen Defektbereich darstellbar. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich auch bei den Xerogel-Granulat Implantaten (Abb. 24 C) eine erhöhte Makrophagenaktivität.

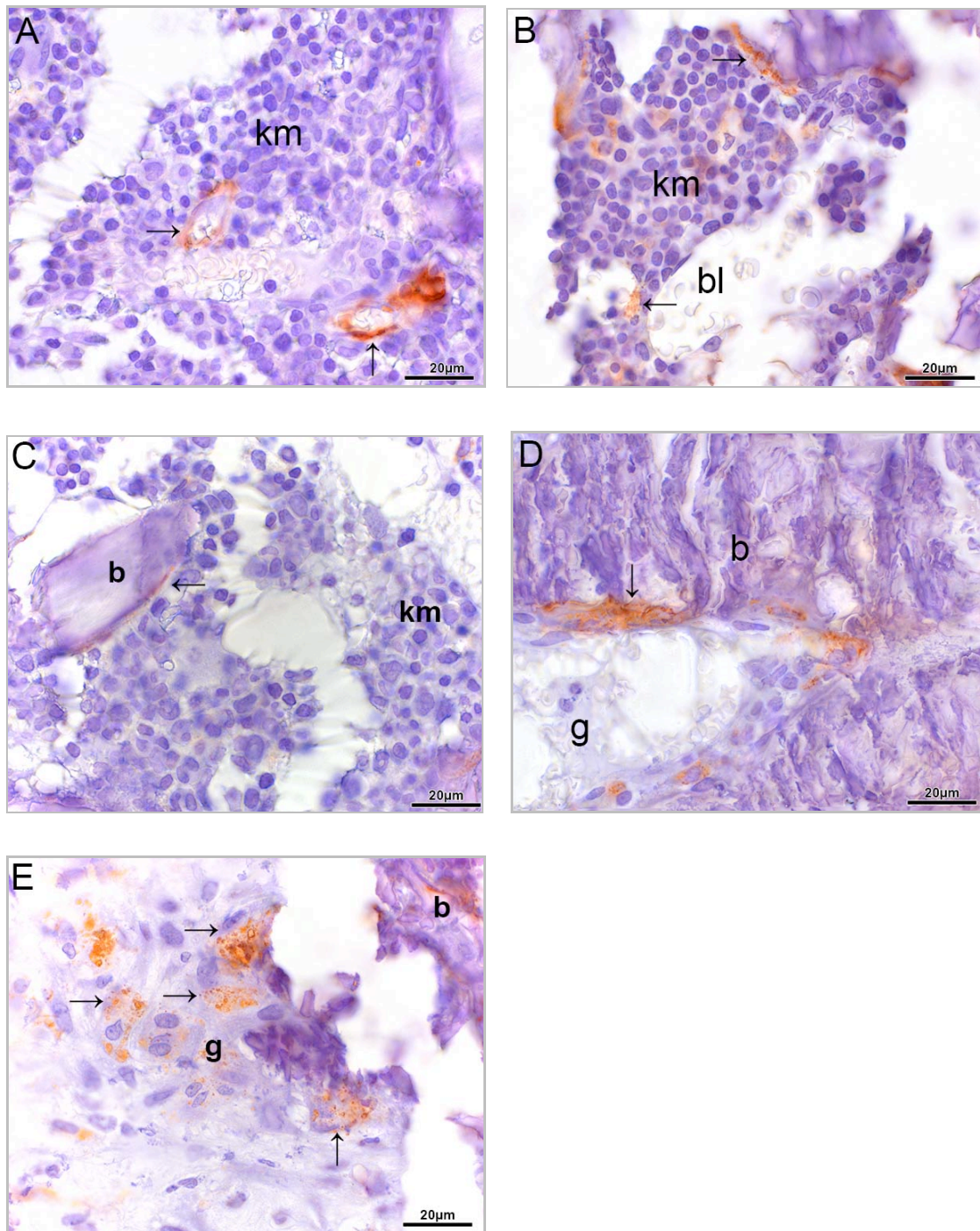


Abbildung. 24:

Die photomikroskopischen Bilder zeigen Vergrößerungen des ehemaligen Defektbereichs an der Grenze zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe zur Darstellung der Makrophagenaktivität. Braune Anfärbung ED1-positiver Zellen (schwarze Pfeile).

Die meisten ED1-positiven Zellen wiesen Schnitte der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantate auf (E). Bei Schnitten des Leerdefekts (A) und Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantate (C) waren nur wenige ED1-positive Zellen angefärbt. Xerogel-Granulat (B), Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib (D) zeigen mehr ED1-positive Zellen. ED1-positive Zellen befinden sich im gesamten ehemaligen Defektbereich, im Speziellen im Granulationsgewebe (g), sowie an der Grenze zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe (b). Km = Spongiosa, bl = Blutgefäß mit Erythrozyten, schwarze Pfeile = ED1- positive Zellen

Vaskularisation

Eine adäquate Frakturheilung basiert auf einer ausreichenden Gefäßversorgung des Knochens. Die Gefäßneubildung im ehemaligen Defektbereich ist deshalb als ein Parameter für die Heilungsfähigkeit des Knochengewebes bestimmt worden.

Für die Beurteilung der Gefäßneubildung erfolgte der Nachweis von Alpha-smooth muscle actin (ASMA). ASMA, auch als Alpha-Actin-2 bekannt, ist eine Isoform des Aktins und kommt in den glatten Muskelzellen vor.

ASMA fungiert als Marker von Fibroblasten, Myofibroblasten und glatten Muskelzellen der Gefäße (Skalli et al., 1989; Nagamoto et al., 2000).

Die Vaskularisation war bei Schnitten der Gruppe 2, 3, 4 und 5 (Abb. 25 B- E) höher als bei der Kontrollgruppe (Abb. 25 A).

Besonders stark ausgeprägt war sie im Bereich des ehemaligen Knochendefekts. Im Granulationsgewebe und am Übergang zwischen Granulationsgewebe und neuem Knochengewebe ließen sich viele neue Gefäße darstellen.

Die stärkste Gefäßneubildung war bei den Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantaten (Abb. 25 D) zu erkennen.

Im Vergleich zu den Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantaten (Abb. 25 C) war sowohl bei den Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantaten als auch bei den Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantaten (Abb. 25 D, E) eine stärkere Vaskularisation festzustellen.

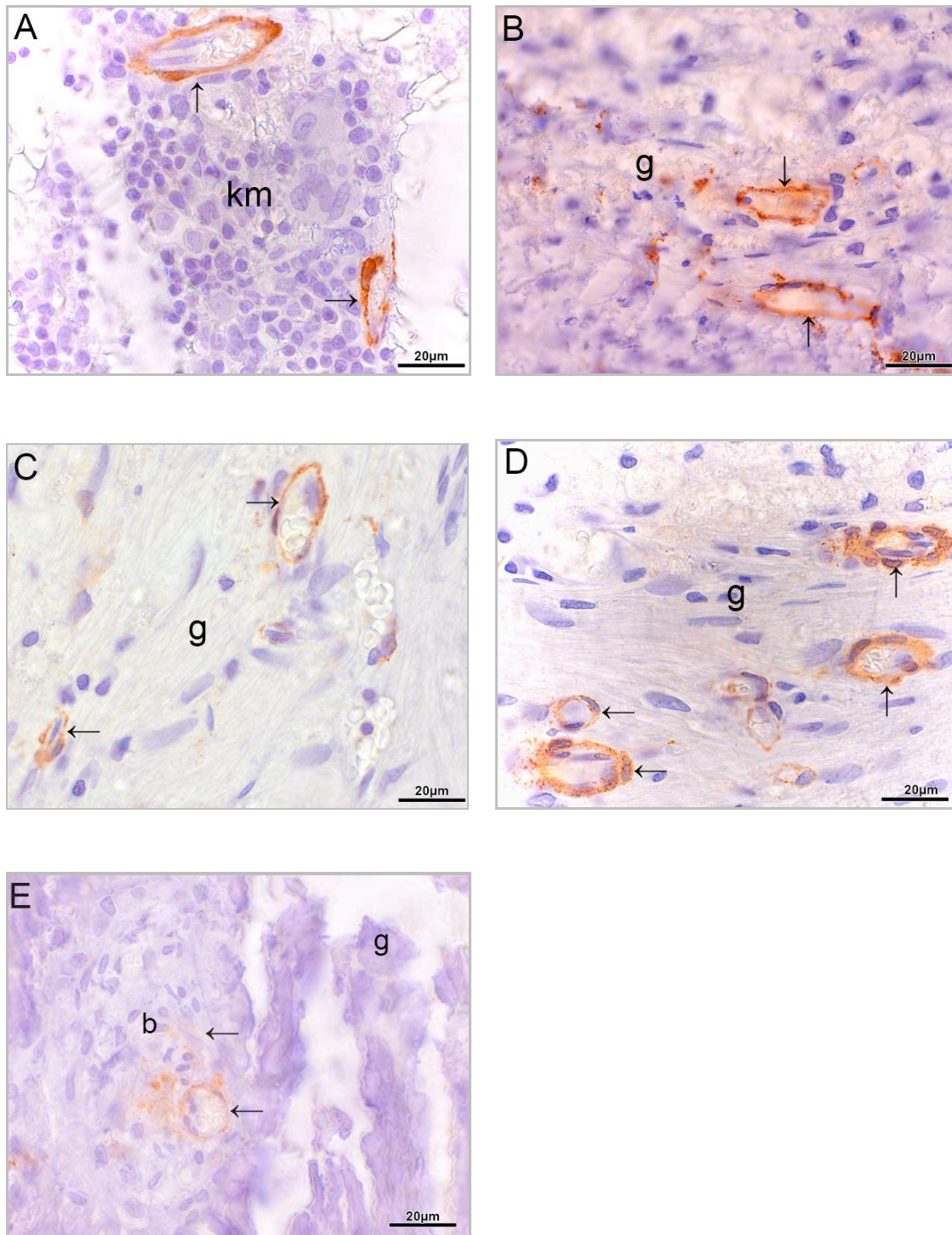


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung entplasteter Schnitte auf alpha smooth muscle actin (schwarze Pfeile) zur Darstellung der Vaskularisation.

Leerdefekt (A), Xerogel-Granulat (B), Xerogel + 100µg (C)/500µg (D)/2500µg (E) Bortezomib
Die geringste ASMA-Aktivität zeigte sich bei Schnitten des Leerdefekts (A). Im Vergleich hierzu fiel die positive Reaktion bei den anderen Gruppen stärker aus (B-E).

4.5 Histomorphometrie

Knochenbildung

Es erfolgte eine histomorphometrische Analyse der Knochenbildung, indem das Verhältnis von Knochengewebe (*bone tissue volume, BV*) zu Bindegewebe (*connective tissue volume, TV*) im ehemaligen Defektbereich (ROI) dargestellt wurde. Hohe Werte (BV/TV) stehen für eine starke Knochenbildung im definierten Bereich.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Knochenbildung ($p < 0,05$) bei den Xerogel-Granulat Implantaten und den Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantaten im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantaten (Abb. 26).

Die höchste Knochenbildung wurde bei den Schnitten der Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib Implantate nachgewiesen. Diese Gruppe wies eine signifikant erhöhte Knochenbildung ($p < 0,05$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantaten auf.

Die geringste Knochenbildung ergab sich bei Schnitten mit Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantaten. Die Knochenbildung war hier im Vergleich zu allen anderen Implantaten und der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) niedriger.

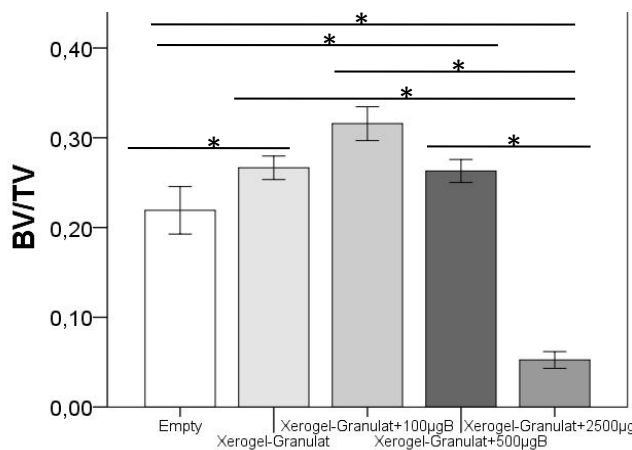


Abbildung 26:

Histomorphometrische Analyse neuer Knochenbildung im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty). Die Sterne stehen für (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$.

Inflammationszone

Die histomorphometrische Auswertung der Inflammationszone erfolgte über den Vergleich der Fläche [mm^2] des Granulationsgewebes. Sie ergab, dass bei allen Implantaten ein Granulationsgewebe nachzuweisen war. Zwischen den Xerogel-Granulat Implantaten ohne Bortezomibapplikation und den Xerogel-Granulat Implantaten mit geringen Bortezomibdosens (Xerogel-Granulat + 100 bzw. 500 μg Bortezomib, siehe Abb. 27) zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der inflammatorischen Reaktion.

Eine signifikant stärker ausgeprägtes Granulationsgewebe konnte jedoch bei den Xerogel-Granulat + 2500 μg Bortezomib Implantaten im Vergleich zu allem anderen Implantaten nachgewiesen werden. Bereits an dieser Stelle soll kurz darauf hingewiesen werden, dass Schnitte dieser Implantate somit einerseits die geringste Knochenbildung und andererseits am meisten Granulationsgewebe aufwiesen (Abb. 26 und 27).

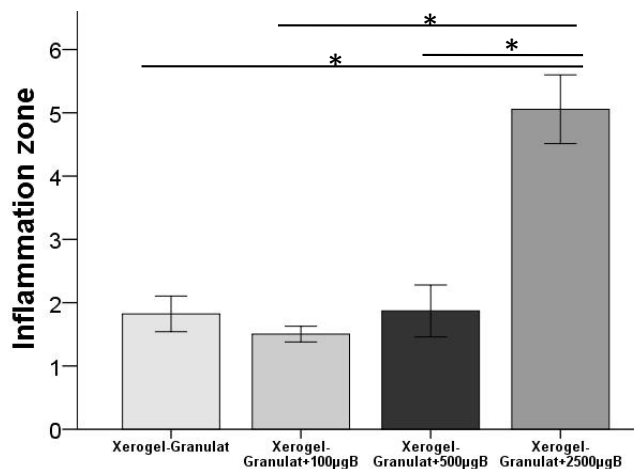


Abbildung 27:

Histomorphometrische Analyse der Fläche [mm^2] des Granulationsgewebes im ehemaligen Defektbereich bei den unterschiedlichen Implantaten. Die Sterne stehen für (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$.

Implantatretention

Im ehemaligen Defektbereich waren bei allen Implantatgruppen Materialreste zu finden. Die histomorphometrische Auswertung ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Implantatgruppen in Bezug auf die Implantatretention gab. Die höchste Implantatretention zeigte sich bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantate.

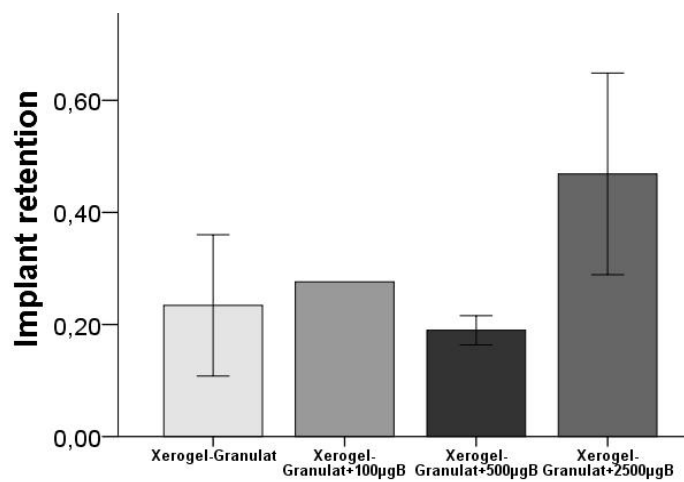


Abbildung 28:

Histomorphometrische Analyse der Implantatretention (als Fläche [mm²]) bei den unterschiedlichen Implantaten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Implantatgruppen.

Osteoblastenfunktion

Die Osteoblastenfunktion wurde histomorphometrisch mithilfe der ALP-Aktivität innerhalb der Region of interest (ROI) analysiert. Die histomorphometrische Auswertung ergänzte die bereits gewonnen histologischen Ergebnisse der Enzymhistochemie. Die ALP-positiven Zellen, die mithilfe der Enzymhistochemie angefärbt worden waren, wurden als Fläche ausgewertet und miteinander verglichen (Abb. 29).

Es ergab sich eine signifikant verstärkte Osteoblastenfunktion im ehemaligen Defektbereich bei Schnitten der Xerogel-Granulat Implantate ($p < 0,05$) und der Xerogel-Granulat Implantate mit 100 μ g Bortezomib ($p < 0,001$) beziehungsweise mit 500 μ g Bortezomib ($p < 0,001$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 29).

Die höchste ALP-Aktivität wurde bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 100 μ g Bortezomib Implantate ermittelt. Die ALP-Aktivität dieser Gruppe war im Vergleich zu den anderen Implantaten signifikant ($p < 0,05$) erhöht.

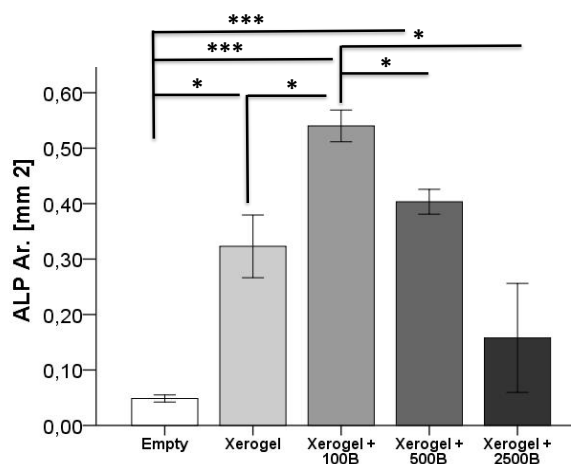


Abbildung 29:

Histomorphometrische Analyse der Fläche [mm²] ALP-positiver Zellen im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty). Die Sterne stehen für (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$.

Osteoklastenfunktion

Ergänzend zu den enzymhistochemischen Ergebnissen wurde die Osteoklastenfunktion analysiert. Für die Histomorphometrie wurde die Anzahl der TRAP-positiven Zellen im ehemaligen Defektbereich gezählt und vergleichend ausgewertet.

Die Osteoklastenfunktion war bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib Implantaten am geringsten. Bei den Schnitten aller anderen Implantate sowie beim Leerdefekt zeigte sich im Vergleich hierzu eine signifikant erhöhte Osteoklastenfunktion ($p < 0,01$) (Abb. 30).

Schnitte der Kontrollgruppe, der Xerogel-Granulat Implantate, der Xerogel-Granulat mit 100µg Bortezomib sowie mit 500µg Bortezomib wiesen keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Osteoklastenfunktion auf.

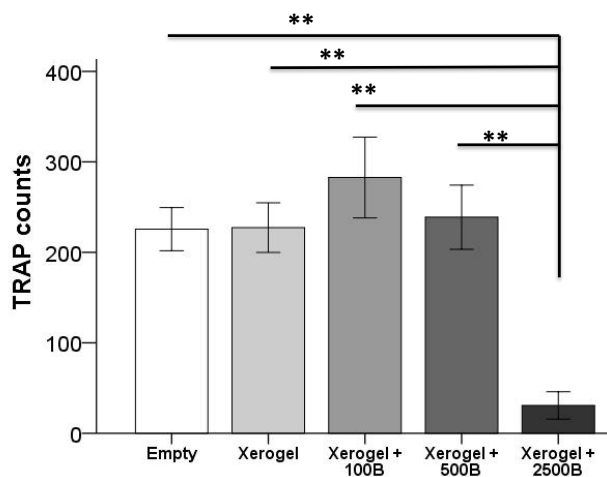


Abbildung 30:

Histomorphometrische Analyse der Osteoklastenfunktion im ehemaligen Defektbereich anhand der Anzahl TRAP-positiver Zellen. Die Sterne stehen für (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$.

OPG/RANKL

Das Verhältnis OPG-positiver Zellen zu RANKL-positiven Zellen wurde histomorphometrisch ausgewertet, um den Knochenumbau der verschiedenen Gruppen zu beurteilen. Hierfür wurde zunächst die Anzahl an OPG-positiven Zellen im ROI sowie an RANKL-positiven Zellen im ROI bestimmt und anschließend das Verhältnis der beiden zueinander bestimmt (Anzahl OPG-positiver Zellen/ Anzahl RANKL-positiver Zellen [%]).

Hohe Werte korrelieren mit verstärktem Knochenaufbau, bei niedrigen Werten überwiegt hingegen der Knochenabbau.

Bei Schnitten der Xerogel-Granulate + 100µg Bortezomib Implantate wurde das höchste OPG/ RANKL-Verhältnis ermittelt. Diese Gruppe zeigte ein signifikant erhöhtes OPG/RANKL-Verhältnis ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Xerogel-Granulat Implantaten, den Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantaten sowie zu der Kontrollgruppe (Abb. 31).

Die histomorphometrische Analyse legte zudem dar, dass das OPG/RANKL-Verhältnis bei Xerogel-Granulat Implantaten signifikant höher war als bei der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) und bei den Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantaten.

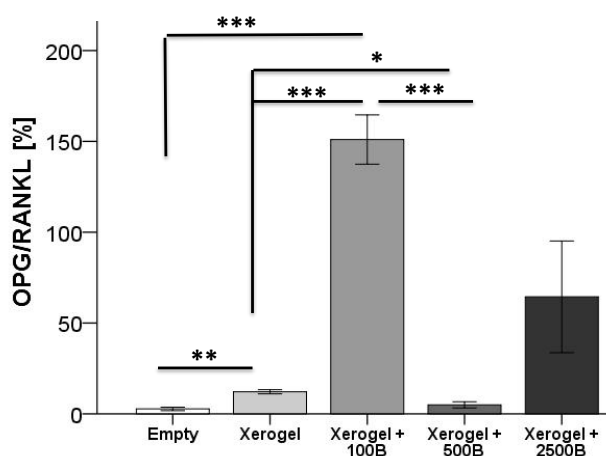


Abbildung 31:

Histomorphometrische Analyse der OPG/RANKL-Rate im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty). Die Sterne stehen für (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$.

Makrophagenaktivität

Die statistische Analyse der bereits mikroskopisch ausgewerteten immunhistochemischen Anfärbungen von ED1-positiven Zellen, die die Makrophagenaktivität widerspiegeln, erbrachte folgende Ergebnisse: Die Makrophagenaktivität war bei den Xerogel-Granulaten ($p < 0,05$) und den Xerogel-Granulat + 500 μ g ($p < 0,05$), bzw. 2500 μ g ($p < 0,01$) Bortezomib signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (Abb. 32).

Die stärkste Makrophagenaktivität zeigten Schnitte der Xerogel-Granulat + 2500 μ g Bortezomib Implantate. Hier war die Aktivität signifikant erhöht gegenüber Schnitten der Xerogel-Granulat + 100 μ g ($p < 0,01$), bzw. 500 μ g ($p < 0,05$) Bortezomib (Abb. 32).

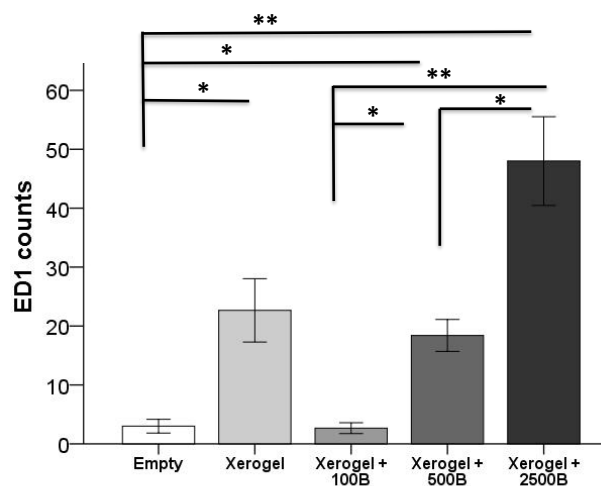


Abbildung 32:

Histomorphometrische Analyse der Makrophagenaktivität anhand der Anzahl ED1-positiver Zellen im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty). Die Sterne stehen für (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$.

Vaskularisation

Die histomorphometrische Analyse der Vaskularisation im ehemaligen Defektbereich erfolgte ergänzend zu der mikroskopischen Auswertung der immunhistochemischen ASMA Färbung. Hierfür wurde die Anzahl ASMA- positiver Zellen im ROI ausgezählt und anschließend zwischen den einzelnen Gruppen verglichen.

Alle Implantate wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Vaskularisation auf ($p < 0,001$ bei Xerogel- Granulat+ 100/500/2500 μ g Bortezomib und $p < 0,01$ bei Xerogel-Granulat).

Die stärkste Vaskularisation herrschte bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 500 μ g Bortezomib Implantaten vor. Die Vaskularisation war hier signifikant höher als bei Schnitten der Xerogel- Granulat Implantate ($p < 0,01$), der Xerogel-Granulat + 100 μ g ($p < 0,01$) und + 2500 μ g ($p < 0,05$) Bortezomib Implantate (Abb. 33).

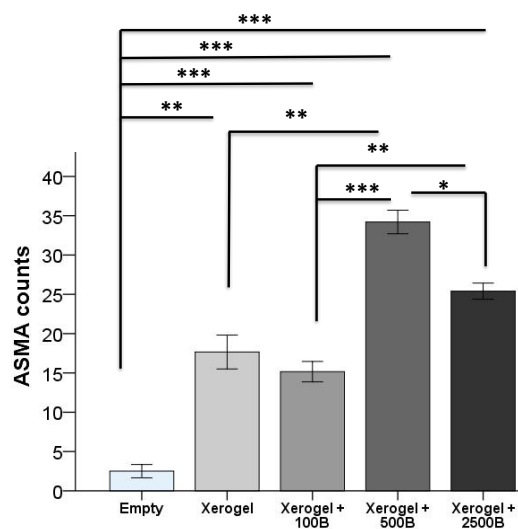


Abbildung 33:

Histomorphometrische Analyse der Gefäßneubildung anhand der Anzahl ASMA-positiver Zellen im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty). Die Sterne stehen für (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$.

5 Diskussion

Die Versorgung komplexer Knochendefekte stellt im klinischen Alltag trotz innovativer Therapieansätze häufig eine Herausforderung dar. Während kleine Defekte spontan ausheilen, benötigen komplexe Knochenläsionen, wie sie bei Knochenmetastasen, Osteolysen und Pseudarthrosen auftreten können, wiederholt chirurgische Interventionen (Hollinger et al., 2008).

Knochenersatzmaterialien dienen in diesen Fällen der Auffüllung des Knochensubstanzdefekts. Biomaterialien müssen jedoch diverse Voraussetzungen erfüllen, um für die klinische Anwendung geeignet zu sein. Das in dieser Arbeit verwendete innovative Biomaterial Xerogel-Granulat erzielte in Bezug auf Biokompatibilität, Festigkeit und Resorbierbarkeit gute Ergebnisse (Cheng et al., 2014; Glenske et al., 2014; Heinemann et al., 2013a).

Das Biomaterial Xerogel-Granulat diente im Rahmen dieser Arbeit zum einen der Defektauffüllung, zum anderen fungierte es als Träger für den Proteasomeninhibitor Bortezomib. So konnte erstmals die Auswirkungen von lokal appliziertem Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel untersucht werden.

Diese experimentelle Untersuchung demonstriert, dass die lokale Applikation von Bortezomib in geringer Dosierung das Knochenwachstum in vivo stimuliert. Dieser Effekt birgt großes Potential, die therapeutischen Möglichkeiten von Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom zu verbessern.

Im Folgenden soll nun erörtert werden, inwiefern sich die Kombination aus Xerogel-Granulat und in unterschiedlicher Menge lokal appliziertem Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel auswirkte. Die enzymhistochemischen, immunhistochemischen und histomorphometrischen Ergebnisse werden hierzu vergleichend diskutiert.

Tiermodell und Studiendesign

Bei dieser Studie wurden Ratten als Versuchstiere ausgewählt. Kaninchen, Schafe und Hunde sind lange Zeit aufgrund der Parallelen zum menschlichen Organismus in Bezug auf die chirurgische Prozedur und die mechanische Belastung der Implantate für Studien zur Knochenheilung bevorzugt worden.

In den letzten Jahren erfolgte ein Umdenken und kleine Nagetiere wie Ratten und Mäuse gewannen zunehmend an Bedeutung (Hollinger et al., 2008; Histing et al., 2011), da sie gegenüber den ehemals favorisierten großen Tieren wesentliche Vorteile aufweisen (Alt et al., 2013):

- ➔ Die Kosten für die Haltung der Tiere ist durch ihre geringe Größe und den verminderten tierpflegerischen Aufwand vergleichsweise niedriger.
- ➔ Die kurze Tragezeit der Ratten ermöglicht die zeitnahe Zucht relativ vieler Tiere.
- ➔ Es stehen viele monoklonale Mausantikörper für Ratten zur Verfügung.
- ➔ Der Gewichtsunterschied von Nagetieren zu Schafen, Kaninchen und Hunden reduziert die Kosten für Versuche mit monoklonalen Antikörpern.

Ein Tiermodell wurde für unsere Untersuchungen bevorzugt, um das Biomaterial Xerogel mit Bortezomib in unterschiedlichen Konzentrationen im Bohrlochmodell des lebenden Knochens vergleichend zu testen.

Die Knochenheilung erfolgt bei Ratten nicht in Haversche Kanälen wie bei Schafen, Kaninchen und Hunden, sondern lediglich in Resorptionshöhlen. Bei der Betrachtung des mikroskopischen Knochenaufbaus ist die Knochenbildung über Resorptionslakunen, was wiederholt als primitive Form kritisiert wurde, jedoch vergleichbar mit dem Haverschen Knochenremodelling (Histing et al., 2011). Der Konsens der aktuellen Studienlage postuliert, dass der Knochenaufbau von Ratten dem des menschlichen Organismus sehr ähnelt und kleine Nagetiere für experimentelle Untersuchungen des Knochenaufbaus, -umbaus und der Knochenreparaturfähigkeit auch auf Grund ihres im Vergleich zum menschlichen Organismus höheren Knochenstoffwechsels geeignet sind (Mukherjee et al., 2008; Richardson et al., 2006; Deramond et al., 1999).

In der vorliegenden experimentellen Untersuchung wurde ein metaphysärer Knochendefekt am distalen Femur gesetzt. Lange Knochen wie beispielsweise der Femur oder die Tibia sind für Frakturmodelle geeignet. Der Femur ist aufgrund seiner schnelleren Reparaturfähigkeit für experimentelle Untersuchungen zu favorisieren (Mukherjee et al., 2008).

Der diaphysäre Knochen heilt über periostale Kallusbildungen, die Zunahme des Durchmessers kompensiert die Ausdünnung der Kortikalis. Bei Defekten des metaphysären Knochens kommt es hingegen zum trabekulären Knochenaufbau mithilfe endostaler Mikrokallusbildung (Webb and Spencer, 2007). Krankheitsbilder, wie das der Osteoporose, führen durch einen pathologisch erhöhten spongiösen Knochenumsatz zu Frakturen, die gehäuft am metaphysären Knochen auftreten. Ein metaphysärer Knochendefekt repräsentiert somit adäquat die Verhältnisse, die bei osteoporotischen Frakturen vorliegen (Richardson et al., 2006; Webb and Spencer, 2007; Hollinger et al., 2008).

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde den Ratten ein Bohrlochdefekt gesetzt. Bohrlochdefekte eignen sich für die Beurteilung der Knochenheilung sowie der Biokompatibilität von Biomaterialien (Alt et al., 2013). Auch die Wirkung des zugefügten Bortezomibs auf den Knochenstoffwechsel ließ sich so gut darstellen.

Kritisch anzumerken ist jedoch, dass Bohrlochdefekte keine klinisch relevanten Fraktursituationen repräsentieren, da die Defektgröße zu gering ist um beispielsweise mit der Knochenheilung bei osteoporotisch bedingten Knochenfrakturen verglichen zu werden. Bohrlochdefekte benötigen zur Knochenheilung prinzipiell keine chirurgische Intervention in Form einer Osteosynthese und überschreiten somit nicht die kritische Größe von Defekten (Poser et al., 2014; Monfoulet et al., 2010). Um den klinischen Nutzen der hier untersuchten Materialien testen zu können, ist demnach ergänzend eine experimentelle Untersuchung mit größeren Defekten anzustreben.

Silikat/Kollagen-Xerogel

Knochenersatzmaterialien müssen eine Reihe allgemeiner und spezifischer Anforderungen erfüllen. Mechanische Stabilität und Biokompatibilität spielen dabei eine wichtige Rolle. Die hier verwendeten Implantate bestehen aus einem Kompositmaterial, dessen unterschiedliche Komponenten synergistische Eigenschaften aufweisen.

Anorganisches Silikat und organisches Kollagen, sind in einem Verhältnis beigefügt, das das humane Knochengewebe imitiert. Die elastischen Eigenschaften des Kollagens ergänzen so die Druckfestigkeit des Silikats, woraus eine hohe Verbundfestigkeit resultiert. Der Anteil der Kollagenfasern erhöht die Elastizität, die eine Zug-, Scher- und Druckstabilität ermöglicht (Cheng et al., 2014).

Der Zweiphasenverbundwerkstoff Xerogel-Granulat hat eine mesoporöse Struktur und eignet sich als Drug-Delivery System. Der beschriebene Sol-Gel Prozess, der bei der Vermischung der Kollagensuspension mit beigefügtem Bortezomib und Kieselsäure entsteht, ermöglicht eine homogene Verteilung des Bortezomibs im Biomaterial und somit eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung (Heinemann et al., 2013a).

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass bisher nur sehr wenige in vivo Ergebnisse des hier verwendeten innovativen Zweiphasenverbundwerkstoffs publiziert worden sind. Kritisiert wird von einigen Autoren zudem, dass der Vorteil des Knochenersatzmaterials bisher noch nicht explizit nachgewiesen werden konnte, da nicht eindeutig geklärt sei, ob die positiven Ergebnisse des Materials auf die Wirkung der Silikat Komponente zurückzuführen sei (Bohner, 2009).

In Bezug auf die Biokompatibilität des verwendeten Xerogels ist eine differenzierte Betrachtung nötig. Zum einen ergeben die hier dargestellten Ergebnisse, dass 30 Tage nach der Implantation der Xerogel-Granulat Materialien das Biomaterial zum größten Teil durch neues Knochengewebe ersetzt worden ist. Sowohl die histologischen als auch die histomorphometrischen Ergebnisse weisen auf eine gute Biodegradierbarkeit und Bioresorbierbarkeit des Materials hin.

Zum anderen zeigten die Implantatgruppen variierende Ergebnisse bezüglich der lokalen Gewebereaktion. Bei Ratten der Implantatgruppe 1-4 ließ sich im ehemaligen Defektbereich histologisch fast ausschließlich mineralisiertes Gewebe und Bindegewebe darstellen und nur vereinzelt zeigten sich inflammatorische Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das verwendete Knochenersatzmaterial an sich oder mit geringen Bortezomibdosen versetzt, keine toxischen oder gewebeschädigenden Effekte aufweist. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen in vivo Untersuchungen überein (Alt et al., 2011).

Bei einigen Tieren ließ sich jedoch im ehemaligen Defektbereich eine entzündliche Reaktion des Gewebes darstellen. Da dies vor allem bei Implantatgruppe 5 vorzufinden war, ist anzunehmen, dass dies eher mit der Applikation von hoch dosiertem Bortezomib in Zusammenhang steht als mit dem verwendeten Biomaterial.

Bortezomib

Bortezomib wurde als erster Vertreter der selektiven Proteasomeninhibitoren in einer klinischen Studie auf seine Wirksamkeit getestet. Bortezomib wird im klinischen Alltag zur systemischen Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt, da es die Tumormasse reduziert und eine anabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel hat (Oyajobi et al., 2007a). Diese Arbeit belegt erstmals einen stimulierenden Effekt lokal verabreichter geringer Dosen Bortezomib auf den Knochenumbau.

Die Therapiemöglichkeiten des Multiplen Myelom haben sich in den letzten Jahren beachtlich verbessert. Hierfür sind unter anderem neu eingeführte Medikamente wie die Proteasomeninhibitoren verantwortlich. Bortezomib, ein potenter Vertreter dieser Klasse, weist einen starken antineoplastischen Effekt auf. Studien zeigen, dass Bortezomib in vivo und in vitro das Tumorwachstum inhibiert und die Tumormasse beim Multiplen Myelom reduziert (Pennisi et al., 2009; Oyajobi et al., 2007b; Oyajobi et al., 2007a). Bortezomib verhindert durch die Blockade des Ubiquitin-Signalwegs den Abbau verschiedener multiple wirksamer regulatorischen Proteine und Transkriptionsfaktoren, die bei der Zellteilung, der Apoptose, bei zellulärer Adhäsion und der Neovaskularisierung involviert sind (Jones et al., 2010).

Oyajobi et al. [2007a] stellten dar, dass Bortezomib den Zelluntergang induziert, dadurch das Überleben der Tumorzellen dezimiert und so zu einer signifikant verringerten Tumormasse des Skeletts führt.

Die wechselseitige Beeinflussung von Knochen- und Tumorstoffwechsel spielt für die Therapie des Multiplen Myeloms eine bedeutende Rolle. Die Interaktion der Myelomzellen mit der Knochen-Mikroumgebung ist Ziel der Proteasomeninhibitoren. Bortezomib beeinflusst den Knochenstoffwechsel, indem es den Knochenaufbau stimuliert und Osteolysen reduziert (Garrett et al., 2003; Lund et al., 2010). Diverse Untersuchungen belegen einen positiven Effekt von Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel (Pennisi et al., 2009; Giuliani et al., 2007; Oyajobi et al., 2007b; Zangari et al., 2012). Die Knochenbildung wird sowohl in pathologischen Situationen wie beim Multiplen Myelom als auch bei gesundem Knochengewebe stimuliert (Pennisi et al., 2009).

Der genaue Wirkmechanismus, über den Bortezomib eine gesteigerte Knochenbildung induziert, ist bisher noch nicht bekannt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Bortezomib vor allem über eine Stimulation der Osteoblastenaktivität die Knochenbildung anregt. Im Zuge dieser Studie führte Bortezomib in geringen Dosen zu einer vermehrten Expression der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (ALP). Der Anstieg ALP-positiver Zellen weist auf eine gesteigerte Osteoblastenaktivität hin. Zur Ergänzung dieser Ergebnisse wurde bei den Präparaten zusätzlich die BMP-2-Aktivität bestimmt. Es zeigte sich, dass die lokale Bortezomibapplikation eine erhöhte BMP-2-Aktivität bewirkte. BMP-2 stimuliert über den Ubiquitin-Signalweg die Osteoblastendifferenzierung auf Ebene der mesenchymaler Stammzellen und der Präosteoblasten (Garrett et al., 2003).

Beide Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass eine lokale Applikation von Bortezomib direkt die Osteoblastenaktivität *in vivo* stimuliert.

Aktuelle *in vivo* und *in vitro* Forschungen präsentieren hiermit übereinstimmende Ergebnisse. Eine Bortezomib Therapie führt bei mit Multiplem Myelom erkrankten Organismen und Zellkulturen zu einer signifikanten Zunahme der Knochenbildung durch eine erhöhte Osteoblastenaktivität und eine gesteigerte Osteoblastenanzahl. Daraus resultiert eine verbesserte Reparaturfähigkeit des Knochens und eine Zunahme des Knochenvolumens, beziehungsweise der Knochendichte (Pennisi et al., 2009; Giuliani et al., 2007). Murkherjee et al. [2008] sowie Giuliani et al. [2007] demonstrierten, dass Bortezomib mesenchymale Stammzellen und Progenitorzellen zu einer Differenzierung zu Osteoblasten anregt. Die Wirkung von Bortezomib auf die Osteoblastenaktivität ließ sich hier ebenfalls durch erhöhte Knochenmarker wie ALP und Osteokalzin darstellen (Zangari et al., 2012). Auch kommt es durch Bortezomib zu einer Blockade von DKK-1 (Dickkopf-1). DKK-1 hemmt als Antagonist des Wnt-Signalwegs die Osteoblastendifferenzierung (Oyajobi et al., 2007b).

Ein weiterer Aspekt ist die Wirkung von Bortezomib auf den gesunden Knochen. Sowohl die histologischen als auch die histomorphologischen Ergebnisse dieser Studie unterstützen die These, dass Bortezomib auch auf gesundes Knochengewebe einen anabolen Effekt hat. Bei unseren Untersuchungen kam es durch eine lokale Verabreichung von Bortezomib in geringen Dosen zu einer signifikant erhöhten Knochenbildung sowie ebenfalls signifikant gesteigerter Osteoblastenfunktion.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein. In vivo und in vitro Testungen ergaben jedoch, dass Bortezomib einen stärkeren Effekt auf entartete Myelomzellen hat als auf physiologisches Knochengewebe (Pennisi et al., 2009). Eine ergänzende experimentelle Untersuchung zur lokalen Bortezomibwirkung auf den Knochenstoffwechsel bei mit Multiplen Myelom erkrankten Organismen ist deshalb zur Komplettierung der hier präsentierten Ergebnisse anzustreben.

Bei 90% der Patienten, die an einem Multiplen Myelom erkranken, treten Knochenmanifestationen auf. Diese beeinträchtigen häufig die Lebensqualität der Patienten, da sie zu Knochenschmerzen, pathologischen Frakturen, Rückenmarkskompressionen und Hyperkalzämien führen können (Zangari et al., 2012). Ursächlich hierfür ist ein pathologischer Knochenstoffwechsel mit zu hoher Osteoklastenaktivität und Knochenresorption, woraus Osteolysen und Knochenläsionen resultieren (Pennisi et al., 2009).

Verschiedene Studien belegen, dass Bortezomib die Anzahl der Osteolysen signifikant verringert, indem es die Osteoklastenaktivität senkt und die Knochenresorption herabsetzt (Zangari et al., 2012; Pennisi et al., 2009; Oyajobi et al., 2007b).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch keinen signifikanten Effekt des Bortezomibs auf die Osteoklastenfunktion. Unsere Untersuchungen ergaben, dass sich die Osteoklastenaktivität, histologisch dargestellt durch die Anfärbung der tartratresistenten sauren Phosphatase, bei Ratten ohne Bortezomib Applikation und bei Ratten mit unterschiedlich hohen Dosen Bortezomib nicht signifikant unterschied.

Diese Ergebnisse lassen sich erklären, indem eine genaue Betrachtung der bisher dokumentierten Wirkung des Bortezomibs auf die Knochenresorption erfolgt. Entartete Multiple Myelomzellen interagieren mit der Knochenmikroumgebung und führen über die Ausschüttung verschiedener Zytokine und Botenstoffe, wie beispielsweise RANKL, direkt und indirekt über die Osteoblastenhemmung zu einer verstärkten Osteoklastenaktivität (Zangari et al., 2012). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sowie aktuelle Publikationen unterstützen die Annahme, dass Bortezomib die Osteoklasten vor allem indirekt beeinflusst, indem es die Tumormasse verringert und somit auch die stimulierende Wirkung der entarteten Myelomzellen auf die Osteoklasten nachlässt (Deleu et al., 2009; Jones et al., 2010; Moreaux et al., 2011; Zangari et al., 2012). Bortezomib bestimmt das Verhältnis von Osteoblasten zu Osteoklasten vor allem über die Stimulation des Knochenstoffwechsels. Deleu et al.

[2009] legten dar, dass der Effekt auf Osteoblasten deutlich stärker ist, als der Effekt auf Osteoklasten.

Ergänzend ist zu berücksichtigen, dass Bortezomib sensibler auf entartete Zellen als auf gesunde Zellen wirkt (Whang et al., 2005). Dies mag ebenfalls dazu beigetragen haben, dass Bortezomib bei unseren Untersuchungen einen geringen Effekt auf die Osteoklasten hatte.

Knochenbildung

Diese Arbeit stellte mithilfe von immunhistochemischen, enzymhistochemischen und histomorphometrischen Untersuchungen die Auswirkungen der unterschiedlichen Implantat Komposite auf die Knochenbildung dar.

Zu Beginn soll darauf hingewiesen werden, dass beim Vergleich der einzelnen Gruppen auffiel, dass ALP- positive wie auch TRAP-positive Zellen am häufigsten am Übergang zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe am Rande des ehemaligen Defektbereichs zu finden waren. Innerhalb der ROI zeigte sich ein je nach Implantatgruppe unterschiedlich stark ausgeprägtes Granulationsgewebe mit schaumartigen, vesikelbeladenen Zellen, Zelltrümmern und Materialresten. Das Implantat war zwar nach vier Wochen fast vollständig resorbiert, jedoch konnten im Granulationsgewebe kaum TRAP-positive oder ALP-positive Zellen nachgewiesen werden. Bei Tieren, die das Xerogel-Granulat ohne Bortezomib oder mit geringen Dosen Bortezomib (Gruppe 2 und 3) erhalten hatten, stellte sich in der *region of interest* neben Granulationsgewebe auch bereits neu gebildetes Knochengewebe sowie TRAP-positive und ALP-positive Zellen dar. Bei Tieren der Implantatgruppen mit hochdosiertem Bortezomib (Gruppe 4 und 5), füllte das Granulationsgewebe den ehemaligen Defektbereich fast vollständig aus, beziehungsweise ragte teilweise sogar darüber hinaus (Gruppe 5).

Es ist jedoch anzunehmen, dass Knochenbildner im weiteren zeitlichen Verlauf in dieses Granulationsgewebe eingewandert wären und es durch Knochengewebe ersetzt hätten.

Zunächst sollen die Auswirkungen des Xerogel-Granulats auf den Knochenstoffwechsel beschrieben werden. Es zeigte sich eine stärkere Knochenbildung mit signifikant mehr

neu gebildetem Knochenvolumen im ehemaligen Defektbereich bei den Versuchstieren mit eingesetzten Xerogel-Granulat Implantaten (Gruppe 2) als bei denen der Kontrollgruppe (Gruppe 1). Bei Präparaten der Gruppe 1 dominierte in der ROI lockeres spongiöses Gewebe und vereinzelt mineralisiertes Gewebe. In Gruppe 2 ließ sich dagegen deutlich mehr mineralisiertes Knochengewebe erkennen.

Diese Ergebnisse kongruieren mit Resultaten verschiedener *in vitro* Testreihen. Heinemann et al. [2011b] wiesen nach, dass in Zellkulturen die Differenzierung von Vorläuferzellen in Osteoblasten und in Osteoklasten auf Xerogel-Biomaterialien entsteht. Das Xerogel-Granulat weist *in vitro* zudem eine hohe Bioaktivität auf, gekennzeichnet durch eine stimulierte Osteoblastogenese und eine supprimierte Osteoklastogenese (Glenske et al., 2014).

Bei den hier vorgestellten Untersuchungen war ebenfalls eine signifikant höhere Osteoblastenaktivität bei den Xerogel-Granulat Implantaten als bei der Kontrollgruppe vorzufinden. Die stimulierte Osteoblastenaktivität der zweiten Implantatgruppe konnte histologisch zum einen durch eine vergleichsweise vermehrte Anzahl ALP-positiver Zellen, zum anderen durch eine erhöhte BMP-2-Aktivität belegt werden.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen OPG/RANKL Färbung weisen ergänzend darauf hin, dass die Xerogel-Granulat Implantate zudem eine erhöhte Osteoblastenaktivität im Vergleich zu der Osteoklastenaktivität bewirken. Bei Gruppe 2 ließ sich vermehrt Osteoprotegrin und weniger RANKL anfärben. Die Histomorphometrie zeigte ebenfalls ein signifikant höheres OPG/RANKL Verhältnis bei Gruppe 2 als bei Gruppe 1.

Eine zentrale Fragestellung dieser Studie war, inwieweit die Dosis des lokal applizierten Bortezomibs Einfluss auf die Knochenheilung hat. Hierfür wurden den Versuchstieren unterschiedlich hohe Dosen Bortezomib verabreicht. Im Vergleich war die Knochenbildung bei den niedrig dosierten Bortezomibdosen (Gruppe 3: Xerogel-Granulat Implantat + 100 µg/g Bortezomib) am höchsten. Hier kam es vier Wochen nach Setzen des Knochendefektes zu einer signifikant erhöhten Knochenbildung im Vergleich zu der Kontrollgruppe und ebenfalls im Vergleich zu der Gruppe, die höhere Dosen Bortezomib (Gruppe 5: Xerogel-Granulat Implantat + 2500 µg/g Bortezomib) erhielt.

In der *Region of interest* präsentierte sich bei Gruppe 3 histologisch reichlich mineralisiertes Knochengewebe. Das Implantat war bei den Präparaten bereits fast

vollständig resorbiert und durch mineralisiertes Gewebe ersetzt. In Vergrößerungen der Movat Färbungen konnte eine besonders stark ausgebildete Osteogenese, die sich als hellgrün gefärbte Zellverbände präsentierte, nachgewiesen werden.

In den ehemaligen Defektbereich waren bereits viele Osteoblasten eingewandert, was durch die Färbung der Alkalischen Phosphatase sowie der BMP2-Färbung verdeutlicht wurde. Die histomorphometrisch nachgewiesene Osteoblastenaktivität korrelierte mit den histologischen Befunden. Im Vergleich zu allen anderen Gruppen war sie bei Gruppe 3 am höchsten.

Diese Ergebnisse weisen erstmals darauf hin, dass die Kombination aus dem Biomaterial Xerogel-Granulat mit lokal appliziertem Bortezomib in geringen Dosen in vivo einen positiven Effekt auf die Knochenbildung hat. Die signifikant erhöhte BMP2-Aktivität spricht dafür, dass Bortezomib durch eine Beeinflussung des Ubiquitin-Signalwegs zu einer Hochregulierung der BMP2-Expression führt woraus eine vermehrte Osteoblastendifferenzierung resultiert.

Weiterhin zeigte sich, dass die Knochenbildung bei den Xerogel-Granulat Implantaten mit geringen Bortezomib Dosen signifikant größer war als bei der Kontrollgruppe und den Xerogel-Granulat Implantaten ohne Bortezomibapplikation. In Bezug auf unsere Arbeit lässt die beobachtete erhöhte ALP-Aktivität annehmen, dass Bortezomib in geringen Dosen über die vermehrte Expression der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase die Osteoblastenaktivität erhöhte. Diese These wird durch die Daten der OPG-RANKL Färbung unterstützt. OPG ist ein Schlüsselfaktor des RANK-RANKL-OPG Systems und hat eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Osteoblastengense und Osteoblastenaktivität. Unsere Ergebnisse zeigen im Vergleich mit den anderen Implantatgruppen die höchste OPG- Aktivität bei einer Bortezomibapplikation in geringen Dosen.

Schließlich ist eine genaue Betrachtung der Implantatgruppe sinnvoll, die Xerogel-Implantate mit sehr hoch dosiertem Bortezomib (Gruppe 5: Xerogel-Granulat + 2500µg/g Bortezomib) erhalten hatten. Bei diesen Tieren ließ sich im Vergleich zu den anderen Gruppen eine negative Wirkung auf die Knochenbildung feststellen. Enzymhistologisch zeigte sich bei Gruppe 5 im ehemaligen Defektbereich eine verminderte Anzahl ALP-positiver Zellen sowie eine verringerte BMP2-Aktivität. Beides spricht für eine geringe Osteoblastenaktivität. Bei der histologischen Betrachtung dieser Implantatgruppe dominierte in der ROI vor allem entzündlich

verändertes Granulationsgewebe mit mehrkernigen Riesenzellen und Kernfragmenten, während nur sehr wenig Knochengewebe erkennbar war.

Die histomorphometrische Untersuchung wies ein signifikant verringertes Knochenvolumen im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf. Die Osteoblastenaktivität war in dieser Gruppe ebenfalls signifikant verringert im Vergleich zu Gruppen mit niedrig dosierten Bortezomib Applikationen.

Die Befunde verdeutlichen, dass Bortezomib je nach Dosierung unterschiedliche Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel hat und weisen darauf hin, dass die lokale Applikation von Bortezomib in hohen Dosen in vivo die Knochenbildung über eine verringerte Osteoblastenaktivität hemmt.

Vaskularisation

Der physiologische Knochenstoffwechsel ist von der Gefäßversorgung des Knochens abhängig. Die Bedeutsamkeit der Vaskularisation bei der Osteogenese sowohl in Bezug auf das Knochenwachstum als auch in Bezug auf die Knochenheilung ist seit vielen Jahren bekannt und Thema zahlreicher Publikationen (Carano and Filvaroff, 2003). Die adäquate Vaskularisation eines Knochendefektes ist eine grundlegende Voraussetzung für die Wiederherstellung von Knochengewebe. Bei unzureichender Gefäßversorgung des Frakturkallus kommt es zu verzögerter Knochenheilung und daraus resultierenden Pseudarthrosen (Lienau et al., 2009).

Im Rahmen dieser experimentellen Untersuchung wurde die Vaskularisation im ehemaligen Defektbereich bei den Implantatgruppen immunhistochemisch und histomorphometrisch verglichen. Mithilfe der Inkubation mit Alpha-Smooth-muscle-actin (ASMA) Primärantikörpern, die die glatten Muskelzellen in der Tunica media der Gefäße markieren, konnten Rückschlüsse auf die Angiogenese gezogen werden. Bei Schnitten der Gruppen 2-5 wurde eine hohe ASMA-Expression festgestellt, was für eine gesteigerte Gefäßneubildung spricht. Die histologische Beurteilung wie auch die Histomorphologie ergaben, dass die Vaskularisation im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei allen Implantatgruppen signifikant höher war (s. Abb. 25, 33).

Dies führt zu der Annahme, dass sich sowohl das Xerogel- Granulat Implantat, als auch die Xerogel-Granulat Implantate mit unterschiedlichen Bortezomib Dosen positiv auf Vaskularisation und Angiogenese im ehemaligen Defektbereich auswirkten.

Supplementär zu diesen Ergebnissen zeigte sich eine vermehrte BMP-Expression bei Schnitten der Gruppen 2-5 im Vergleich zu der Kontrollgruppe. BMP2 ist einerseits ein Marker der Osteogenese zum anderen ist jedoch auch bekannt, dass BMP2 die Angiogenese induziert (Carano and Filvaroff, 2003). Eine vermehrte BMP2-Expression deutet somit ebenfalls auf eine gesteigerte Gefäßbildung hin.

Inflammatorische Reaktion

Bei Gruppe 5 (Xerogel-Granulat Implantat + 2500 µg/g Bortezomib) fällt auf, dass sich die Ergebnisse in fast allen Bereichen deutlich von den anderen Gruppen unterscheiden. Wie bereits erwähnt hemmte die lokal applizierte hohe Dosis Bortezomib, die die Tiere dieser Gruppe erhielten, die Knochenbildung und Osteoblastenaktivität und stimulierte sie nicht wie bei den anderen Gruppen. Zusätzlich sind immense Unterschiede bei der histologischen Beurteilung des ehemaligen Defektbereichs zu erkennen, die auf eine toxische und schädliche Wirkung des Bortezomibs in hohen Dosen auf das Knochengewebe rückschließen lässt. Bei der MOVAT-Färbung sowie der Toluidin-Blau-Färbung dieser Schnitte präsentierte sich in der *Region of interest*, anstelle eines mineralisierten oder bindegewebigen Gewebes, ein Defektbereich der sich in den umgebenden Lagerknochen ausbreitet. In diesem Bereich waren Implantatresiduen, Kernfragmente und schaumig aussehende Zellen zu erkennen. Die zumeist mehrkernigen Riesenzellen zeichneten sich durch eine Vielzahl von Vakuolen aus und leiten sich wie auch Osteoklasten von Zellen des Granulozyten- Makrophagen Systems ab. Athanasou and Quinn [1990] wiesen mithilfe des Nachweises verschiedener Antigene wie CD 13 nach, dass mehrkernige Riesenzellen auch von ihrem Phänotyp dem von Monozyten und Makrophagen ähneln. Mononukleare Monozyten und Makrophagen sind fast überall im Körper zu finden und haben je nach Ort unterschiedlichste spezifische Funktionen. Im Falle beispielsweise einer entzündlichen Reaktion entstehen aus mononuklearen Percursorzellen unter anderem polykaryontische Zellen wie die hier beschriebenen Riesenzellen.

Das Vorfinden dieser Zellen spricht, in Übereinstimmung mit den histologischen Befunden, für eine entzündliche Reaktion im ehemaligen Defektbereich, die durch die gewebebeschädigende Wirkung des Bortezomibs in hohen Dosen ausgelöst wurde.

Zur Ergänzung der histologischen Beurteilung der MOVAT-Färbungen wurde außerdem eine immunhistochemische ED-1-Markierung durchgeführt. Der ED-1-

Nachweis dient der Markierung von Makrophagen und deren Phagozytenaktivität. Es zeigte sich, dass bei Schnitten der Xerogel-Granulat Implantate + 2500 µg/g Bortezomib deutlich mehr ED-1-positive Zellen angefärbt wurden als bei den anderen Implantatgruppen. Die histomorphologischen Ergebnisse spiegeln dies ebenfalls wieder. Diese erbrachten eine signifikant erhöhte Makrophagenaktivität bei Schnitten der Xerogel-Granulat Implantate + 2500 µg/g Bortezomib sowohl im Vergleich mit der Kontrollgruppe als auch mit den Gruppen, die das Xerogel-Granulat Implantat mit niedrigen Dosen Bortezomib (Gruppe 3 und 4) erhalten hatte.

Die erhöhte Makrophagenaktivität spricht für die Herkunft der beschriebenen mehrkernigen Riesenzellen von Makrophagen. Das wird ebenfalls dadurch bestätigt, dass die Zellen nicht mithilfe der TRAP- Färbung markiert werden konnten. Dennoch ist die eindeutige Herkunft dieser Zellen bisher noch nicht bekannt (Athanasou and Quinn, 1990).

Die erhöhte Makrophagenaktivität und die histologischen Veränderungen bei Schnitten der Xerogel-Granulat Implantate + 2500 µg/g Bortezomib deuten darauf hin, dass hohe Dosen von lokal appliziertem Bortezomib im Knochengewebe die Knochenbildung verhindern und stattdessen eine inflammatorische Reaktion auslösen. Während bei Schnitten der anderen Implantatgruppen der ehemalige Defektbereich mit mineralisiertem Gewebe ausgefüllt worden war, zeigte sich hier gefäßreiches Granulationsgewebe mit segmentierten neutrophilen Granulozyten und mehrkernigen Riesenzellen.

Aktuelle in vivo Studien bestätigen unsere Ergebnisse. Oyajobi et al. [2007a] wiesen nach, dass eine systemische Gabe Bortezomib bei mit Multiplen Myelom erkrankten Mäusen die Tumorlast signifikant senkte. Sehr hohe Dosen Bortezomib zeigten jedoch auch bei diesen Untersuchungen sowohl bei den erkrankten Mäusen als auch bei gesunden Mäusen einen toxischen Effekt.

Ausblick

Zusammenfassend betrachtet ergaben unsere Untersuchungen, dass die lokale Bortezomib-Applikation in niedrigen Dosen in vivo die Knochenbildung über eine erhöhte Osteoblastendifferenzierung, Osteoblastenaktivität und Vaskularisation im ehemaligen Defektbereich bei gesunden Ratten steigerte. Des Weiteren ließ sich kein relevanter Effekt von Bortezomib auf die Osteoklastenanzahl darstellen.

Daraus lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die lokale Bortezomib-Applikation in geringen Dosen die Knochenheilung fördert. Die lokale Bortezomib-Applikation ist ein zukunftsweisendes und innovatives Verfahren, dass bei der Behandlung des Multiplen Myeloms und den häufig assoziierten pathologischen Knochendefekten immenses therapeutisches Potential bietet.

Es muss jedoch klar zum Ausdruck gebracht werden, dass unsere Ergebnisse durch weitere Untersuchungen ergänzt werden sollten. Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wirkstoffkonzentration der lokalen Bortezomib Applikation eine bedeutende Rolle spielt. Bei den hier vorgestellten experimentellen Untersuchungen wirkten sich hohe Dosen Bortezomib negativ auf die Knochenheilung aus. Weiterführende Untersuchungen zur lokalen Applikation niedriger Bortezomibdosen sollten deshalb durchgeführt werden um die optimale Wirkstoffkonzentration zu ermitteln.

Im Rahmen dieser Studie wurde die lokale Applikation von Bortezomib in vivo bei gesunden Ratten getestet. Des weiteren sollte geklärt werden, wie sich die lokale Applikation bei mit an Multiplem Myelom erkrankten Organismen auf die Knochenheilung auswirkt. Aktuelle Studien belegen in diesem Zusammenhang eine stärkere Wirkung von Bortezomib auf die Knochenheilung bei mit Multiplen Myelom erkrankten Organismen als bei gesunden (Pennisi et al., 2009). Es ist deshalb anzunehmen, dass der hier beobachtete positive Effekt der lokalen Bortezomibapplikation noch deutlicher ausfallen würde. Dies ist jedoch bisher weder in vivo noch in vitro untersucht worden

6 Zusammenfassung

Die Versorgung von Knochensubstanzdefekten und komplexen Frakturen mit Knochenersatzmaterialien zur Defektauffüllung stellt in der Orthopädie und der Unfallchirurgie eine häufige Herausforderung dar. Innovative Biomaterialien spielen hier eine immer größere Rolle, da herkömmliche Materialien relevante Nachteile aufweisen. Das Kompositmaterial Silikat/Kollagen-Xerogel ist ein vielversprechendes neuartiges Material, dessen Biokompatibilität bisher noch nicht in vivo getestet wurde. Bei malignen Neoplasien wie dem Multiplen Myelom kommt es durch Osteolysen zu eben jenen beschriebenen komplexen Knochensubstanzdefekten. Im Zuge dieser Arbeit konnte durch die Verwendung von Xerogel-Granulat als Trägersubstanz für den Proteasomeninhibitor Bortezomib eine lokale Wirkung des Bortezomibs erzielt werden. Neben einer Defektauffüllung ermöglicht dies auch eine lokale Therapie des Multiplen Myeloms.

Zur Durchführung dieser experimentellen Arbeit wurde ein Tiermodell mit Ratten ausgewählt, da eine in vivo Testung der verwendeten Implantate nötig ist, um mit dem menschlichen Organismus vergleichbare Bedingungen zu erreichen und so die Verträglichkeit sowie die Wirkung auf den Knochenstoffwechsel adäquat beurteilen zu können. Nagetiere eignen sich für die Untersuchung von Knochenumbauprozessen.

Die Implantation des Xerogel-Granulats mit beigefügtem Bortezomib in definierter Konzentration erfolgte in einen standardisierten Bohrlochdefekt im Bereich der Metaphyse des lateralen Femurkondylus von 2,5 mm Durchmesser und 4 mm Tiefe bei 24 weiblichen 120 Tage alten Ratten. Acht weitere Ratten erhielten das Xerogel-Granulat Implantat ohne zusätzlich beigefügtes Bortezomib, während abermalig acht Ratten mit je einem Leerdefekt als Negativkontrolle fungierten (insgesamt n=40).

Alle Tiere wurden 30 Tage nach Setzen des Knochendefekts in CO₂-Narkose getötet und die operierten Femora wurden zur weiteren Untersuchung entnommen. Es erfolgte die histologische, immunhistochemische und histomorphometrische Darstellung der Knochenheilung.

Die enzymhistologischen, immunhistologischen und histomorphometrischen Untersuchungen zeigten erstmals, dass die lokale Bortezomibapplikation in geringer

Wirkstoffkonzentration die Knochenbildung förderte. Die Osteoblastenaktivität und Osteoblastendifferenzierung erwies sich bei diesen Tieren signifikant erhöht, während keine relevanten Unterschiede in Bezug auf die Osteoklastenanzahl ermittelt wurden.

Eine lokale Bortezomibapplikation in hohen Dosen führte hingegen über eine niedrige Osteoblastenaktivität zu einer verringerten Knochenbildungsrate. Bei dieser Implantatgruppe präsentierte sich im ehemaligen Defektbereich ein Granulationsgewebe, das sich in den umliegenden Lagerknochen ausbreitete. Dies spricht für eine gewebsschädigende Wirkung des lokal applizierten Bortezomibs in hohen Dosen.

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sich das Silikat/Kollagen-Xerogel ohne zusätzliche Bortezomibapplikation positiv auf den Knochenstoffwechsel auswirkte, indem es die Knochenbildung, die Osteoblastogenese und die Osteoblastenaktivität stimulierte.

Es wird aufgrund der hier erzielten Ergebnisse empfohlen, die Wirkung des lokal applizierten Bortezomibs bei mit Multiplen Myelom erkrankten Organismen zu testen. Die optimale Wirkstoffkonzentration von Bortezomib sollte zudem in einer weiteren experimentellen Untersuchung ermittelt werden.

7 Summary

The treatment of bone defects and complex fractures with biomaterials is a major challenge in orthopedic surgery. Innovative biomaterials play an increasing role, since conventional materials have shown relevant disadvantages. The composite material silica/collagen xerogel is a promising novel material, nevertheless its biocompatibility has not been tested *in vivo*, yet.

Malignant neoplasms such as multiple myeloma with subsequent osteolyses and fractures result in complex bone substance defects. The aim of this study was to evaluate the use of silica/collagen xerogel as a carrier substance for the proteasome inhibitor bortezomib in order to achieve a local therapy of the multiple myeloma with bortezomib. Furthermore, this work tested the role of a locally applied proteasome inhibitor bortezomib in bone healing.

The implantation of silica/collagen xerogel with different concentrations of bortezomib (subgroup 3: 100µg/g bortezomib; subgroup 4: 500µg/g bortezomib; subgroup 5: 2500µg/g bortezomib)

was implanted in a standardized drilled hole defect (2.5 mm in diameter and 4 mm in depth) in the metaphysis of the lateral femoral condyle of 24 female healthy Sprague Dawley rats (4 months old). Eight rats were implanted with plain xerogel granulate implant without bortezomib which served as the control and eight rats without any material (empty defect) served as a negative control. 30 days after the surgery all animals were euthanized and the operated femora were harvested for further investigations. Histological, immunohistochemical and histomorphometric analysis were carried out to determine bone healing.

The study revealed that locally applied bortezomib in low drug concentration stimulates bone healing. In these animals the osteoblast activity and osteoblast differentiation significantly increased, whereas no relevant differences were seen in the number of osteoclasts. This data is in accordance with the findings from the immunohistochemistry where an increase of prominent bone formation markers like BMP2 and OPG/RANKL

ratio was also seen. On the other hand, locally applied bortezomib at high-doses resulted in reduced bone formation due to low osteoblast activity. In the case, an inflammation zone was seen in the defect area, spreading into the surrounding bone. This indicates a tissue-damaging effect of the locally applied bortezomib at high doses. The study also showed that the silica / collagen xerogel without bortezomib also had a positive effect on bone healing by enhancing bone formation, osteoblastogenesis and osteoblast activity in comparison with the empty defect only.

In anticancer treatment local delivery of anticancer agents to the neoplasia via biomaterial carriers has never been reported before. The current study presents the concepts and the first *in vivo* results for proteasome inhibitor composite biomaterials for local delivery of bortezomib to proliferative multiple myeloma bone lesions including concentration measurements at different anatomical regions in a rat model. The results therefore, suggest a stimulatory effect of bortezomib on new bone formation when applied locally which might also contribute to the antimyeloma efficacy of this drug.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AP	Alkalische Phosphatase
APRIL	Zytokin a proliferation inducing ligand
ASCT	autologous hematopoietic stem cell transplantation
ASMA	Alpha smooth muscle actin
ATF4	Activating transcription factor 4
β -TrCP1	beta-transducing repeat containing protein 1
BFR	bone formation rate
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
BMP-2/4	bone morphogenetic protein 2/4
BMU	Basic Multicellular Unit
BCRP	breast-cancer related protein
BV	bone tissue volume
cm	Centimeter
CSF-1 bekannt)	colony stimulating factor-1 (auch als M-CSF
CPC	Calciumphosphatzement
DKK-1	Dickkopf-related protein 1
Dmp1	dentin matrix acidic phosphoprotein 1
FDZ	Frizzled
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
HDT	Hochdosischemotherapie
HGF	hepatocyte growth factor
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IGF 1/2	insulin-like growth factor ½
IkBs	inhibitor of NF-KappaB
IL-1/6	Interleukin 1/6
kD	Kilo Dalton
kg	Kilogramm

kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
LFA-1	leukocyte function-associated antigen 1
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
µm	Mikrometer
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor, auch CSF-1 genannt
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEPE/ OF45	Matrix extracellular phosphoglycoprotein, auch Osteoblast/ osteocyte factor 45 genannt
mg	Milligramm
MGUS	monoclonal gammopathy of unknown significance
MIP-1alpha	macrophage inflammatory protein alpha
mm	Millimeter
MRP	MDR- related Protein
MSC	mesenchymal stem cell
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated cells
NFKB2/p100	Nuclear factor NF-Kappa-B p100 subunit protein
OAF	Osteoklastenaktivierender Faktor
ODF	osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegrin
OPGL	Osteoprotegrin ligand
PDGF-BB	platelet-derived growth factor BB
Phex	Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTH	Parathormon
RANK	receptor activator of nuclear Kappa-B
RANKL	ligand of receptor activator of nuclear Kappa-B
ROI	region of interest
Runx2	Runt-related transcription factor 2
s.c.	subcutan
SDF-1 alpha	stromal cell-derived factor 1 α

Shn3	Schnurri-3
STH	Somatotropin
TCF	T-Zellfaktor
TGF-Beta	transforming growth factor beta
TNF α , TNF β	Tumornekrosefaktor α / β
TRANCE	tumor necrosis factor-related activation- induced cytokine
TRAF3	TNF receptor associated factor 3 protein coding gene
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
TV	connective tissue volume
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late antigen 4
vol.%	Volumenprozent
WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase
1	

9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** 1a: In Epon eingebettete TEM-Aufnahme zeigt einen in der Zellkultur angezüchteten Osteoklasten auf Knochenfragment. [mit freundlicher Genehmigung von Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler]
1b: Darstellung eines Osteoklasten und seiner charakteristischen Eigenschaften [aus Bartl, 2010]
- Abbildung 2:** 2a: In Epon eingebettete TEM-Aufnahme zeigt einen Osteoblasten auf neu gebildetem Kollagen. [mit freundlicher Genehmigung von Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler]
2b: Uneingebettete Aufnahme eines trockenen Knochens in TEM stellt die zentral in der Knochenmasse eingebetteten Osteozyten mit Zytoplasmaausläufern in Canaliculi ossei dar. [mit freundlicher Genehmigung von Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler]
- Abbildung 3:** Überblick über die verschiedenen Phasen des Knochenumbaus und die daran beteiligten Zellsysteme und Botenstoffe [aus Dominguez et al., 2011]
- Abbildung 4:** Das RANK- RANKL-OPG System und seine Wirkung auf die Osteoklastogenese [aus Bartl, 2010]

Abbildung 5: Interaktion zwischen Plasmazellen und der Mikroumgebung des Knochenmarks [aus Harousseau and Moreau, 2009]. Reproduziert mit Genehmigung der Copyright Massachusetts Medical Society

Abbildung 6: Darstellung der Wirkmechanismen von Proteasomeninhibitoren auf Osteoblasten- und Osteoklastenprecursorzellen [aus Yaccobi, 2010]

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung eines Xerogels (vgl. Heinemann, 2011a).

Abbildung 8: **Operationsmethode**

A: Übersicht der verwendeten OP-Instrumente

B-E: Unter Narkose erfolgte eine großflächige Rasur des distalen linken Femurs sowie der proximalen Tibia (B). Nach Rechtsseitenlagerung (C), Fixierung der Extremität und Desinfektion wurde eine mediale Inzision zur Darstellung des distalen Femurs vorgenommen (D-E). Der metaphysäre Knochendefekt wurde mithilfe eines Bohrlochdefekts (F) gesetzt und je nach Gruppe mit Biomaterial aufgefüllt. Schließlich wurde die Wunde mithilfe einer Klammernaht und Nobecutan-Spray® verschlossen.

Abbildung 9: A: Avidin-Biotin Complex (ABC) Methode

B: das auf Polymeren basierende EnVision™ System

(vgl. http://www.dako.com/de/08002_ihc_staining_methods.pdf)

Abbildung 10: Bild A zeigt eine MOVAT- Pentachrome Färbung der Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib Implantgruppe. Zur besseren

Orientierung ist in Bild B der ehemalige Defektbereich mit einem schwarzen Kreis umrundet. Dieser Bereich entspricht der ROI und ist von besonderer Bedeutung für die Analyse der Knochenbildung und der Biokompatibilität des Biomaterials.

Abbildung 11: MOVAT-Pentachrome Photomikroskop Aufnahmen mit je einer Übersicht des Defektbereichs, sowie einer Vergrößerung des mit einem Rechteck markierten Areals. Leerdedefekt (A, C) und Xerogel-Granulat Implantat (B, D)

Abbildung 12: MOVAT- Pentachrome Übersichtsbilder des Defektbereichs und Vergrößerung des mit einem Rechteck markierten Bereichs. Xerogel-Granulat + 100 µg Bortezomib (A, C), Xerogel-Granulat + 500 µg Bortezomib (B, D)

Abbildung 13: Movat- Pentachrome Färbung: Übersichtsbild des Defektbereichs und Vergrößerung des markierten Rechtecks. Xerogel-Granulat + 2500 µg Bortezomib (A, B)

Abbildung 14: Darstellung der Inflammationszone mit verschiedenen Vergrößerungen Toluidine-blau angefärbter Schnitte der Xerogel-Granulat + 2500 µg Bortezomib Gruppe.

Abbildung 15: Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen der ROI des Leerdefekts (A, C) und der Xerogel-Granulat Implantate (B, D) mit dunkel-violett angefärbten ALP-positiven Zellen.

Abbildung 16: Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen des mit einem Rechteck markierten Bereichs der Xerogel-Granulat Implantate + 100µg (A, C) oder 500µg (B, D) Bortezomib mit dunkel-violett angefärbten ALP-positiven Zellen.

Abbildung 17: Anfärbung ALP-positiver Zellen bei Xerogel-Granulat Implantaten + 2500µg Bortezomib in einer Übersichtsaufnahme (A) und einer Vergrößerung des mit einem Rechteck markierten Bereichs (B).

Abbildung 18: Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen der ROI des Leerdefekts (A, C) und der Xerogel-Granulat Implantate (B, D) mit rot angefärbten TRAP-positiven Zellen.

Abbildung 19: Übersichtsaufnahmen und Vergrößerungen der ROI der Xerogel-Granulat Implantate + 100µg (A, C) und 500µg (B, D) Bortezomib mit rot angefärbten TRAP-positiven Zellen.

Abbildung 20: Anfärbung TRAP-positiver Zellen bei Xerogel-Granulat Implantaten + 2500µg Bortezomib in einer Übersichtsaufnahme (A) und einer Vergrößerung der ROI (B).

Abbildung 21: Immunhistochemische OPG Färbung der unterschiedlichen Implantatgruppen:

Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung entplasteter Schnitte auf RANKL:

- Abbildung 23:** Die vergrößerten Darstellungen des ehemaligen Defektbereichs zeigen eine vermehrte BMP2 Expression bei Schnitten der Xerogel-Granulat + 100µg Bortezomib (C), Xerogel-Granulat + 500µg Bortezomib (D) sowie der Xerogel-Granulat + 2500µg Bortezomib (E) Implantate im Vergleich mit dem Leerdefekt (A) und den Xerogel-Ganulat Implantaten (B).
- Abbildung 24:** Die photomikroskopischen Bilder zeigen Vergrößerungen des ehemaligen Defektbereichs an der Grenze zwischen Granulationsgewebe und Knochengewebe zur Darstellung der Makrophagenaktivität. Braune Anfärbung ED1-positiver Zellen (schwarze Pfeile).
- Abbildung 25:** Immunhistochemische Färbung entplasteter Schnitte auf alpha smooth muscle actin (schwarze Pfeile) zur Darstellung der Vaskularisation.
- Abbildung 26:** Histomorphometrische Analyse neuer Knochenbildung im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty).
- Abbildung 27:** Histomorphometrische Analyse der Fläche [mm²] des Granulationsgewebes im ehemaligen Defektbereich bei den unterschiedlichen Implantaten.
- Abbildung 28:** Histomorphometrische Analyse der Implantatretention (als Fläche [mm²]) bei den unterschiedlichen Implantaten.

Abbildung 29: Histomorphometrische Analyse der Fläche [mm²] ALP-positiver Zellen im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty).

Abbildung 30: Histomorphometrische Analyse der Osteoklastenfunktion im ehemaligen Defektbereich anhand der Anzahl TRAP-positiver Zellen

Abbildung 31: Histomorphometrische Analyse der OPG/RANKL Rate im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty).

Abbildung 32: Histomorphometrische Analyse der Makrophagenaktivität anhand der Anzahl ED1-positiver Zellen im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty).

Abbildung 33: Histomorphometrische Analyse der Gefäßneubildung anhand der Anzahl ASMA-positiver Zellen im ehemaligen Defektbereich (ROI) bei den unterschiedlichen Implantaten und der Kontrollgruppe (Empty).

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Versuchstiere in verschiedene Gruppen mit jeweils zugehörigem Implantat

Tabelle 2: Zeitplan des Tierversuchs

Tabelle 3: Zeitplan der Technovit 9100 - Einbettung

Tabelle 4: Protokoll der Toluidin-Blau Färbung

Tabelle 5: Immunhistochemie bei verwendetem ABC- System

Tabelle 6: Protokoll Immunhistochemie bei verwendetem ENVISION System

Tabelle 7: Vorbereitung der einzelnen Komponenten für die immunhistochemischen Färbungen

11 Literaturverzeichnis

A, H., and M.e, K. (1995). Enhanced polymer detection system for immunohistochemistry: infectious bronchitis virus as a model. Western Poultry Disease Conference.

Adler, C.-P. (2004). Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts (Berlin, Heidelberg: Springer).

Aescht, E., Büchl-Zimmermann, S., Burmester, A., Dänhardt-Pfeiffer, S., Desel, C., Hamers, C., Jach, G., Kässens, M., Makovitzky, J., Mulisch, M., et al. (2010). Romeis Mikroskopische Technik (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

Alt, V., Kögelmaier, D.V., Lips, K.S., Witt, V., Pacholke, S., Heiss, C., Kampschulte, M., Heinemann, S., Hanke, T., Thormann, U., et al. (2011). Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT. *Acta Biomater* 7, 3773–3779.

Alt, V., Thormann, U., Ray, S., Zahner, D., Dürselen, L., Lips, K., El Khassawna, T., Heiss, C., Riedrich, A., Schlewitz, G., et al. (2013). A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta Biomater* 9, 7035–7042.

Athanasou, N.A., and Quinn, J. (1990). Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function. *J Clin Pathol* 43, 997–1003.

Bartl, R. (2010). Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie (Georg Thieme Verlag).

Bartl, R., and Bartl, C. (2013). Osteoporose-Manual: Diagnostik, Prävention und Therapie (Springer-Verlag).

Bodine, P.V.N., and Komm, B.S. (2006). Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 33–39.

Bohner, M. (2009). Silicon-substituted calcium phosphates - a critical view. *Biomaterials* 30, 6403–6406.

Bonewald, L.F. (2007). Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116, 281–290.

Boyce, B.F., and Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 139–146.

Carano, R.A.D., and Filvaroff, E.H. (2003). Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today* 8, 980–989.

Cheng, C., Alt, V., Pan, L., Thormann, U., Schnettler, R., Strauss, L.G., Heinemann, S., Schumacher, M., Gelinsky, M., Nies, B., et al. (2014). Application of F-18-sodium fluoride (NaF) dynamic PET-CT (dPET-CT) for defect healing: a comparison of biomaterials in an experimental osteoporotic rat model. *Med. Sci. Monit.* 20, 1942–1949.

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., et al. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85–A, 1544–1552.

Chilosi, M., Lestani, M., Pedron, S., Montagna, L., Benedetti, A., Pizzolo, G., and Menestrina, F. (1994). A rapid immunostaining method for frozen sections. *Biotech Histochem* 69, 235–239.

Deleu, S., Lemaire, M., Arts, J., Menu, E., Van Valckenborgh, E., Vande Broek, I., De Raeve, H., Coulton, L., Van Camp, B., Croucher, P., et al. (2009). Bortezomib alone or in combination with the histone deacetylase inhibitor JNJ-26481585: effect on myeloma bone disease in the 5T2MM murine model of myeloma. *Cancer Res.* 69, 5307–5311.

Deramond, H., Wright, N.T., and Belkoff, S.M. (1999). Temperature elevation caused by bone cement polymerization during vertebroplasty. *Bone* 25, 17S–21S.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29, 313.

ten Dijke, P. (2006). Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr Med Res Opin* 22 *Suppl 1*, S7-11.

Dijkstra, C.D., Döpp, E.A., Joling, P., and Kraal, G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54, 589–599.

Dominguez, L.J., Di Bella, G., Belvedere, M., and Barbagallo, M. (2011). Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. *Biogerontology* 12, 397–408.

Dorozhkin, S.V. (2009). Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *J Mater Sci* 44, 2343–2387.

Eom, K.-S., Kim, S.J., Lee, J.-J., Suh, C., Kim, J.S., Yoon, S.-S., Kim, B.S., Kang, H.J., Choi, Y.J., Kim, C.S., et al. (2014). Changes in Osteoblastic Activity in Patient Who Received Bortezomib as Second Line Treatment for Plasma Cell Myeloma: A Prospective Multicenter Study, Changes in Osteoblastic Activity in Patient Who Received Bortezomib as Second Line Treatment for Plasma Cell Myeloma: A Prospective Multicenter Study. *BioMed Research International*, BioMed Research International 2014, 2014, e245247.

Fassl, Horst (2012). Einführung in die medizinische Statistik: mit 38 Tabellen (UTB für Wissenschaft: Uni -Taschenbücher).

Garrett, I.R., Chen, D., Gutierrez, G., Zhao, M., Escobedo, A., Rossini, G., Harris, S.E., Gallwitz, W., Kim, K.B., Hu, S., et al. (2003). Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.* 111, 1771–1782.

Giuliani, N., Morandi, F., Tagliaferri, S., Lazzaretti, M., Bonomini, S., Crugnola, M., Mancini, C., Martella, E., Ferrari, L., Tabilio, A., et al. (2007). The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation in vitro and in vivo in multiple myeloma patients. *Blood* 110, 334–338.

Glenske, K., Wagner, A.-S., Hanke, T., Cavalcanti-Adam, E.A., Heinemann, S., Heinemann, C., Kruppke, B., Arnhold, S., Moritz, A., Schwab, E.H., et al. (2014). Bioactivity of xerogels as modulators of osteoclastogenesis mediated by connexin 43. *Biomaterials* 35, 1487–1495.

Goldschmidt, H. (2002). *Das Multiple Myelom* (Bremen u.a.: UNI-MED).

Harousseau, J.-L., and Moreau, P. (2009). Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 360, 2645–2654.

Hayman, A.R. (2008). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41, 218–223.

Heinemann, S. (2010). *Entwicklung und Charakterisierung biokompatibler Kompositxerogele im System Silikat-Kollagen-Calciumphosphat für den Knochenersatz.*

Heinemann, S. (2011a). *Entwicklung biokompatibler Kompositxerogele für den Knochenersatz: Eine biomimetische Materialentwicklung im System Silikat-Kollagen-Calciumphosphat und seine Charakterisierung* (Saarbrücken: Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften).

Heinemann, C., Heinemann, S., Worch, H., and Hanke, T. (2011b). Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *Eur Cell Mater* 21, 80–93.

Heinemann, S., Heinemann, C., Ehrlich, H., Meyer, M., Baltzer, H., Worch, H., and Hanke, T. (2007a). A Novel Biomimetic Hybrid Material Made of Silicified Collagen: Perspectives for Bone Replacement. *Adv. Eng. Mater.* 9, 1061–1068.

Heinemann, S., Ehrlich, H., Knieb, C., and Hanke, T. (2007b). Biomimetically inspired hybrid materials based on silicified collagen. *IJMR* 98, 603–608.

Heinemann, S., Heinemann, C., Bernhardt, R., Reinstorf, A., Nies, B., Meyer, M., Worch, H., and Hanke, T. (2009). Bioactive silica–collagen composite xerogels modified by calcium phosphate phases with adjustable mechanical properties for bone replacement. *Acta Biomaterialia* 5, 1979–1990.

Heinemann, S., Coradin, T., and Desimone, M.F. (2013a). Bio-inspired silica–collagen materials: applications and perspectives in the medical field. *Biomater. Sci.* 1, 688–702.

Heinemann, S., Heinemann, C., Wenisch, S., Alt, V., Worch, H., and Hanke, T. (2013b). Calcium phosphate phases integrated in silica/collagen nanocomposite xerogels enhance the bioactivity and ultimately manipulate the osteoblast/osteoclast ratio in a human co-culture model. *Acta Biomater* 9, 4878–4888.

Heiss, C., and Schnettler, R. (2005). [Bioresorbable bone adhesives. Historical perspective and current status]. *Unfallchirurg* 108, 348–355.

Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Anderson, K.C. (2004). Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104, 607–618.

Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 7, 585–598.

Histing, T., Garcia, P., Holstein, J.H., Klein, M., Matthys, R., Nuetzi, R., Steck, R., Laschke, M.W., Wehner, T., Bindl, R., et al. (2011). Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49, 591–599.

Hollinger, J.O., Onikepe, A.O., MacKrell, J., Einhorn, T., Bradica, G., Lynch, S., and Hart, C.E. (2008). Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *J. Orthop. Res.* 26, 83–90.

Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577–580.

Janssen, J. and Laatz, W. (2013). *Statistische Datenanalyse mit SPSS. Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests* (Springer- Verlag).

Jones, D.C., Wein, M.N., Oukka, M., Hofstaetter, J.G., Glimcher, M.J., and Glimcher, L.H. (2006). Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. *Science* 312, 1223–1227.

Jones, M.D., Liu, J.C., Barthel, T.K., Hussain, S., Lovria, E., Cheng, D., Schoonmaker, J.A., Mulay, S., Ayers, D.C., Bouxsein, M.L., et al. (2010). A proteasome inhibitor,

bortezomib, inhibits breast cancer growth and reduces osteolysis by downregulating metastatic genes. *Clin. Cancer Res.* 16, 4978–4989.

Kehrer, M., Koob, S., Strauss, A., Wirtz, D., Schmolders, J. (2017). Multiples Myelom – aktuelle Standards in Diagnostik und Therapie. *Z Orthop Unfall.* 155(05): 575-586

Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Sugisawa, H., Kohara, H., Yoshimatsu, M., Takano-Yamamoto, T., Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., et al. (2014). Effect of Cytokines on Osteoclast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of the Periodontal Membrane, Effect of Cytokines on Osteoclast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of the Periodontal Membrane. *The Scientific World Journal*, 2014.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., et al. (1998). Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 93, 165–176.

Lambrecht, J.T. (1991). *Resorbierende Knochenzellen des Menschen in vitro* (München: Hanser).

Lienau, J., Schmidt-Bleek, K., Peters, A., Haschke, F., Duda, G.N., Perka, C., Bail, H.J., Schütze, N., Jakob, F., and Schell, H. (2009). Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J. Orthop. Res.* 27, 1133–1140.

Lüllmann-Rauch, R., and Paulsen, F. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie* (Stuttgart: Thieme).

Lund, T., S e, K., Abildgaard, N., Garnero, P., Pedersen, P.T., Ormstrup, T., Delaiss , J.-M., and Plesner, T. (2010). First-line treatment with bortezomib rapidly stimulates both osteoblast activity and bone matrix deposition in patients with multiple myeloma, and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Eur. J. Haematol.* 85, 290–299.

Monfoulet, L., Rabier, B., Chassande, O., and Fricain, J.-C. (2010). Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration. *Calcif. Tissue Int.* 86, 72–81.

Moreaux, J., Hose, D., Kassambara, A., Reme, T., Moine, P., Requirand, G., Goldschmidt, H., and Klein, B. (2011). Osteoclast-gene expression profiling reveals osteoclast-derived CCR2 chemokines promoting myeloma cell migration. *Blood* 117, 1280–1290.

Moschetta, M., Kawano, Y., Podar, K. (2016). Targeting the Bone Marrow Microenvironment. *Cancer Treatment and Research*, 63-102.

Mukherjee, S., Raje, N., Schoonmaker, J.A., Liu, J.C., Hideshima, T., Wein, M.N., Jones, D.C., Vallet, S., Buxsein, M.L., Pozzi, S., et al. (2008). Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 491–504.

Oyajobi, B.O., Muñoz, S., Kakonen, R., Williams, P.J., Gupta, A., Wideman, C.L., Story, B., Grubbs, B., Armstrong, A., Dougall, W.C., et al. (2007a). Detection of myeloma in skeleton of mice by whole-body optical fluorescence imaging. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1701–1708.

Oyajobi, B.O., Garrett, I.R., Gupta, A., Flores, A., Esparza, J., Muñoz, S., Zhao, M., and Mundy, G.R. (2007b). Stimulation of new bone formation by the proteasome inhibitor, bortezomib: implications for myeloma bone disease. *Br. J. Haematol.* *139*, 434–438.

Patil, S., and Paul, S. (2014). A Comprehensive Review on the Role of Various Materials in the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells with a Special Focus on the Association of Heat Shock Proteins and Nanoparticles. *Cells Tissues Organs* *199*, 81–102.

Pennisi, A., Li, X., Ling, W., Khan, S., Zangari, M., and Yaccoby, S. (2009). The proteasome inhibitor, bortezomib suppresses primary myeloma and stimulates bone formation in myelomatous and nonmyelomatous bones in vivo. *Am. J. Hematol.* *84*, 6–14.

Pietak, A.M., Reid, J.W., Stott, M.J., and Sayer, M. (2007). Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* *28*, 4023–4032.

Poser, L., Matthys, R., Schawalder, P., Pearce, S., Alini, M., and Zeiter, S. (2014). A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *Biomed Res Int* *2014*, 348635.

Pratap, J., Lian, J., Stein, G. (2010). Metastatic Bone Disease: Role of Transcription Factors and Future Targets. *Bone* *2011*, 30-36.

Radin, S., Falaize, S., Lee, M.H., and Ducheyne, P. (2002). In vitro bioactivity and degradation behavior of silica xerogels intended as controlled release materials. *Biomaterials* *23*, 3113–3122.

Rau, T.S. (2009). Optimierungspotentiale für das Einwachsverhalten lasttragender Implantate in Knochengewebe: Eine strukturierte, biomechanische Analyse regenerativer und adaptiver Fähigkeiten des Knochens (Ilmenau: TU Ilmenau Universitätsbibliothek).

Reffitt, D.M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H.F.J., Evans, B. a. J., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., and Hampson, G.N. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 32, 127–135.

Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., and Boccaccini, A.R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413–3431.

Richardson, P.G., Briemberg, H., Jagannath, S., Wen, P.Y., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Siegel, D.S., Irwin, D., Schuster, M., et al. (2006). Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J. Clin. Oncol.* 24, 3113–3120.

Sabattini, E., Bisgaard, K., Ascani, S., Poggi, S., Piccioli, M., Ceccarelli, C., Pieri, F., Fraternali-Orcioni, G., and Pileri, S.A. (1998). The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 51, 506–511.

da Silva, R.A.B., Ferreira, P.D.F., De Rossi, A., Nelson-Filho, P., and Silva, L.A.B. (2012). Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod* 38, 803–813.

Singhal, S., and Mehta, J. (2006). Multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol* 1, 1322–1330.

Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J., and Meyer, H.G. (1970). The Unlabeled Antibody Enzyme Method of Immunohistochemistry Preparation and Properties of Soluble Antigen-Antibody Complex (horseradish Peroxidase-Antihorseradish Peroxidase) and Its Use in Identification of Spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18, 315–333.

Teixeira, J.O., and Urist, M.R. (1998). Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch Orthop Trauma Surg* 117, 27–34.

Udagawa, N. (2003). The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 21, 337–343.

Urist, M. (1996). Bone: Formation by Autoinduction. *Science* 150 (3698), 893-899.

Verbeek, M.M., Otte-Höller, I., Wesseling, P., Ruiter, D.J., and de Waal, R.M. (1994). Induction of alpha-smooth muscle actin expression in cultured human brain pericytes by transforming growth factor-beta 1. *Am J Pathol* 144, 372–382.

Webb, J.C.J., and Spencer, R.F. (2007). The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br* 89, 851–857.

Whang, P.G., Gamradt, S.C., Gates, J.J., and Lieberman, J.R. (2005). Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on osteolytic human prostate cancer cell metastases. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 8, 327–334.

Yaccoby, S. (2010). The role of the proteasome in bone formation and osteoclastogenesis. *IBMS BoneKEy* 7, 147–155.

Zangari, M., Terpos, E., Zhan, F., and Tricot, G. (2012). Impact of bortezomib on bone health in myeloma: a review of current evidence. *Cancer Treat. Rev.* 38, 968–980.

Zhou, H., Wei, J., Wu, X., Shi, J., Liu, C., Jia, J., Dai, C., and Gan, Q. (2010). The bio-functional role of calcium in mesoporous silica xerogels on the responses of osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 21, 2175–2185.

Zhou, X., Qin, X., Zhang, X., Ye, L. (2010). Downregulation of Dickkopf-1 is responsible for high proliferation of breast cancer cells via losing control of Wnt/ β -catenin signaling. *Acta Pharmacol Sin* 31, 202-210.

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler, für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Möglichkeit das Labor für experimentelle Unfallchirurgie nutzen zu dürfen. Ich möchte mich außerdem für die großartige fachliche Unterstützung bei ihm bedanken, er hat mir mit kritischen Diskussionen und konstruktiven Vorschlägen geholfen, die Qualität dieser Arbeit zu verbessern.

Ich möchte Frau Dr. med. vet. Ursula Sommer für Ihre große Hilfe danken. Sie hat mir an zahlreichen Tagen mit viel Geduld zur Seite gestanden und bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen.

Ganz herzlich möchte ich mich beim ganzen Team des Labors für experimentelle Unfallchirurgie bedanken. Keine Frage blieb unbeantwortet und bei Problemen wurde ich stets freundlich und kompetent unterstützt.

Insbesondere geht mein Dank an Dr. Seemun Ray, Tanja Rehling, Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna und Dr. med. Ulrich Thormann. Sie haben mir bei der Durchführung der Tierversuche, den vielfältigen immunhistochemischen und enzymhistochemischen Färbungen und den anschließenden Auswertungen, sowie bei statistischen Fragen geholfen.


Ich danke zudem Kirsten Berg und Hotte Brandt für die gewissenhafte Unterstützung.

Zuletzt geht mein Dank an meinen Ehemann, meine Schwester Lotta Brandt, meine Eltern und an meinen Großvater ohne deren Geduld und Liebe diese Arbeit nicht beendet worden wäre.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

14 Anhang



Note: Copyright.com supplies permissions but not the copyrighted content itself.

1

2

3

PAYMENT

REVIEW

CONFIRMATION

Step 3: Order Confirmation

Thank you for your order! A confirmation for your order will be sent to your account email address. If you have questions about your order, you can call us 24 hrs/day, M-F at +1.855.239.3415 Toll Free, or write to us at info@copyright.com. This is not an invoice.

Confirmation Number: 11707439
Order Date: 03/27/2018

If you paid by credit card, your order will be finalized and your card will be charged within 24 hours. If you choose to be invoiced, you can change or cancel your order until the invoice is generated.


Payment Information

Nora Kröhl;hle
 nora.brandt@t-online.de
 +49 17664100809
 Payment Method: n/a

Order Details

IBMS boneKEY

Order detail ID: 71089054
Order License Id: 4317120233479
ISSN: 1940-8692
Publication Type: e-Journal
Volume:
Issue:
Start page:
Publisher: INTERNATIONAL BONE AND MINERAL SOCIETY
Author/Editor: International Bone and Mineral Society

Permission Status:  **Granted**
Permission type: Republish or display content
Type of use: Thesis/Dissertation

[Hide details](#)

Requestor type	Publisher, not-for-profit
Format	Print, Electronic
Portion	chart/graph/table/figure
Number of charts/graphs/tables/figures	1
The requesting person/organization	Nora Kröhle, Justus Liebig Universität Giessen
Title or numeric reference of the portion(s)	Fig. 1
Title of the article or chapter the portion is from	Yaccoby, S. (2010). The role of the proteasome in bone formation and osteoclastogenesis. IBMS BoneKEy 7, 147–155.
Editor of portion(s)	N/A
Author of portion(s)	N/A
Volume of serial or monograph	N/A
Page range of portion	page 148
Publication date of portion	08/2018
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for	

the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Worldwide
In the following language(s)	Original language of publication
With incidental promotional use	no
Lifetime unit quantity of new product	Up to 499
Title	Einfluss von Bortezomib in Xerogel-Biomaterialien auf die Knochenbildung und Knochenresorption im Tiermodell
Instructor name	Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler
Institution name	Justus Liebig Universität Giessen
Expected presentation date	Aug 2018
Attachment	

Note: This item will be invoiced or charged separately through CCC's **RightsLink** service. [More info](#)

\$ 0.00

Total order items: 1

This is not an invoice.

Order Total: 0.00 USD



RE: Academic/Clinical Site License Service

26.03.2018 17:59

Von Permissions <permissions@mms.org>
An nora.brandt@t-online.de <nora.brandt@t-online.de>

Dear Nora,

Content (full-text or portions thereof) may be used in print and electronic versions of your dissertation or thesis without formal permission from the Massachusetts Medical Society, Publisher of the New England Journal of Medicine.

The following credit line must be printed along with the copyrighted material:
"Reproduced with permission from (scientific reference citation), Copyright Massachusetts Medical Society.

Sincerely,
Judy Benford
NEJM Permissions

nora.brandt@t-online.de

Mar 26, 3:58 AM EDT

* Question/Comment: contact you to ask you if I can use one of your figures for my thesis. In this Summer I hope I can finish my thesis (medicine, Germany) about the influence of bortezomib in xerogel biomaterials on bone formation. In this thesis I describe the effect of Multiple myeloma on bone remodelling process. Therefore I would like to use one of your published figure "Interactions between plasma cells and the bone marrow microenvironment" of the publication „Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma“ (Harousseau, J.-L., and Moreau, P. (2009). Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. N. Engl. J. Med. 360, 2645–2654. Fig. 1b). I won't publish my thesis commercial, I will only print it about 10 times for my University (JLU Gießen). I need Your license to use your figure for my thesis. It would be very friendly if you sent me this paper.

* Email Address: nora.brandt@t-online.de

* First Name: Nora

* Last Name: Kröhle

* Suffix: Mrs.

* Country/Region: Germany

* Address 1: Woynastr. 4

* City: Mainz

* Zip/Postal Code: 55118

This email is a service from NEJM Group. Delivered by [Zendesk](#)


[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)

SPRINGER NATURE

Title: Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates

Author: Ligia J. Dominguez, Giovanna Di Bella, Mario Belvedere et al

Publication: Biogerontology

Publisher: Springer Nature

Date: Jan 1, 2011

Copyright © 2011, Springer Nature

Logged in as:
Nora Kröhle

[LOGOUT](#)

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Nora Kröhle ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[printable details](#)

License Number	4316390029276
License date	Mar 26, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Biogerontology
Licensed Content Title	Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates
Licensed Content Author	Ligia J. Dominguez, Giovanna Di Bella, Mario Belvedere et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2011
Licensed Content Volume	12
Licensed Content Issue	5
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Einfluss von Bortezomib in Xerogel-Biomaterialien auf die Knochenbildung und Knochenresorption im Tiermodell
Instructor name	Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler
Institution name	Justus Liebig Universität Giessen
Expected presentation date	Aug 2018
Portions	Fig. 1.b.
Specific Languages	german
Attachment	
Requestor Location	Nora Kröhle Woyenstr. 4 Mainz, 55118 Germany Attn: Nora Kröhle

Billing Type	Invoice
Billing address	Nora Kröhle Woyenstr. 4 Mainz, Germany 55118 Attn:
Total	0.00 EUR

[ORDER MORE](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2018 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Georg Thieme Verlag KG LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This is a License Agreement between - (Licensee) and Georg Thieme Verlag KG (Licensor) provided by IPR License. The license consists of the order details below and the terms and conditions. All payments must be made in full to IPR License. For payment instructions, please refer to the information listed on the associated invoice.

Order Details

License Number	2940/18
License Date	22/03/2018
License Fee	44.94 EUR

Details about the licensor

Rightsholder	Georg Thieme Verlag KG
Address	Rüdigerstraße 14
City	Stuttgart
Postcode/Zip	70469
Country	Germany
VAT Number	147638607

Details about the licensee

Rights buyer	Nora Kröhle
Company Name	-
Address	Woyenstr. 4
City	Mainz
Postcode/Zip	55118
Country	Germany

Details of original work

Title	Osteoporose
Author	Bartl, Reiner
ISBN	9783131549440

Publisher	Georg Thieme Verlag KG
-----------	------------------------

Details of request

Type of re-use	Thesis/Dissertation
Type of user	Non - Commercial
Asset information	Image
No of Image	2
Allowed quantity Print	5
Details	Image (1)
Location in original work	Fig. 1.7
Location in new work	Fig. 1.b
Reproduction	Original Colour
Image Proportion	Quarter page or less
Details	Image (2)
Location in original work	page 18
Location in new work	fig. 4
Reproduction	Original Colour
Image Proportion	Quarter page or less

Details of Destination

Project title	Einfluss von Bortezomib in Xerogel-Biomaterialien auf die Knochenbildung und Knochenresorption im Tiermodell
Authors/Contributor(s)	-
Institution	-
Publication date	01/08/2018
Word count	22418
Publication Country	Germany

Terms and Conditions

The requested material has been released by the publisher indicated in your order data. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, You have agreed that the following terms and conditions apply to this licence. They apply in conjunction with IPR's payment terms, which you agreed to when you opened your IPR buyer account. These terms